



**Caracterização dos mecanismos de resistência aos antibióticos
em estirpes de origem humana, ambientes associados aos
cuidados de saúde e veterinária**

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Vanessa Alexandra Reis Salgueiro

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Manuela Caniça
Professora Doutora Maria Teresa Rebelo

Notas prévias:

A Professora Doutora Manuela Caniça, do Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS), do Departamento de Doenças Infeciosas, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, participou como orientadora externa nesta dissertação de mestrado.

A Professora Doutora Maria Teresa Rebelo do Departamento de Biologia Animal, da Faculdade de Ciências, da Universidade de Lisboa, participou como orientadora interna nesta dissertação de mestrado.

A Doutora Eugénia Ferreira do Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS), do Departamento de Doenças Infeciosas, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, participou como co-orientadora nesta dissertação de mestrado.

As referências desta dissertação de mestrado seguem os critérios da revista “*Frontiers in Microbiology*”.

Agradecimentos

À **Doutora Manuela Caniça**, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, pela orientação e conhecimentos partilhados.

À **Doutora Eugénia Ferreira**, por todo o acompanhamento e ajuda, por tudo aquilo que me ensinou e pela boa disposição.

À **Doutora Teresa Rebelo**, por toda a ajuda e disponibilidade demonstradas.

À **Doutora Vera Manageiro**, por toda a paciência e ajuda imprescindível durante todos estes meses, assim como, pela disponibilidade que sempre demonstrou para responder a todas as minhas dúvidas.

À **Daniela Jones-Dias**, por estar sempre disponível a parar o seu trabalho para me auxiliar e esclarecer as minhas dúvidas.

À **Raquel Romão, Inês Moura e Joana Almeida**, por todos os bons momentos e pela ajuda. Um especial obrigado à Raquel pelo apoio demonstrado e por estar sempre disponível para ouvir os meus desabafos.

Aos meus **pais**, um enorme obrigado por todo apoio durante este meu percurso. Obrigada por me aturarem nos meus bons e maus momentos e por se mostrarem sempre disponíveis para me ouvir falar do meu trabalho, mesmo que muitas vezes não percebiam aquilo que eu digo.

Aos meus **amigos**, pela amizade e apoio.

Ao “**clube do livro**”, por toda a boa disposição que alegrou muitos dos meus dias mais “cinzentos”.

À **Doutora Manuela Caniça** e ao **Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge**, por me proporcionarem todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Resumo

A resistência aos antibióticos é atualmente um problema de saúde pública a nível mundial. Este fenómeno envolve diversos mecanismos e espécies bacterianas, revelando-se de extrema importância a sua compreensão, através de investigação e vigilância, para evitar possíveis disseminações. Neste âmbito, este trabalho teve como principal objetivo a caracterização de mecanismos de resistência aos antibióticos em 139 estirpes bacterianas com três origens distintas: hospitalares (*Acinetobacter baumannii*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus epidermidis*), ambiente de instituições de cuidados continuados (*Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter pittii*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Pantoea* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *S. capitis*, *Staphylococcus capitis/caprae/warneri*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus xyloso*) e animais (*S. aureus* e *Staphylococcus simiae*).

A realização de testes de suscetibilidade aos antibióticos (difusão em disco e E-teste) permitiu não só a identificação de estirpes com suscetibilidade diminuída às várias classes de antibióticos ensaiadas, mas também a orientação da pesquisa de genes de resistência por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Procurou-se estudar a diversidade genética das estirpes de *A. baumannii* através da deteção de linhagens clonais com importância internacional e MLST (*Multilocus Sequence Typing*). No caso particular de *S. aureus*, a tipagem dos genes *spa* e *agr*, assim como MLST, permitiram estabelecer relações genéticas entre estas estirpes. Por outro lado, o método de PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), utilizado para *K. oxytoca*, possibilitou a avaliação da clonalidade de uma estirpe ambiental em relação a estirpes de origem clínica.

A maioria das estirpes coletadas em hospitais possuía um fenótipo de multirresistência, ao contrário das estirpes com origem nos lares e em animais. Aí se destaca a suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina e cefoxitina, esta última por expressão do gene *mecA*, em *S. aureus* e a suscetibilidade diminuída aos carbapenemes em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, diminuindo as opções de tratamento disponíveis para infeções causadas por estas bactérias. Em *A. baumannii* foram encontrados os genes *bla_{OXA-66}* e *bla_{OXA-23}* e a sequência de inserção IS*Aba1*. Em *P. aeruginosa* detetaram-se os genes *bla_{GES-7-tipo}*, *bla_{VEB-tipo}*, *bla_{VIM-2}* e *bla_{VIM-11}*.

A identificação do mesmo tipo de *spa* e ST em estirpes de *S. aureus* com origem humana e animal demonstra a possível disseminação entre estes dois reservatórios. A caracterização molecular permitiu ainda identificar uma eventual transferência de uma estirpe

e/ou de determinantes de resistência entre *S. capitis* de um hospital e de um lar, situados na mesma área geográfica.

Os lares e os animais, em paralelo com o Homem, poderão ser reservatórios de genes de resistência. Assim, é essencial um melhor conhecimento dos mecanismos de resistência e das vias de disseminação nestes reservatórios, para intervir e controlar a sua emergência e expansão.

Palavras-chave: multirresistência, MRSA, carbapenemes, reservatórios.

Abstract

Antibiotic resistance is currently a worldwide public health problem that can include diverse mechanisms and bacterial species. The understanding of such phenomena is essential to avoid further dissemination, namely through research studies and monitoring.

The main aim of this study was the characterization of antibiotic resistance mechanisms in 139 bacterial strains collected in three different origins: humans admitted to healthcare facilities (*Acinetobacter baumannii*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus epidermidis*), air samples from long term care facilities (*Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter pittii*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Pantoea* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *S. capitis*, *Staphylococcus capitis/caprae/warneri*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus xyloso*) and animals (*S. aureus* and *Staphylococcus simiae*).

Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion and E-test allowed not only the identification of strains showing reduced susceptibility to several antibiotic classes, but also oriented the search for antibiotic resistance genes by PCR (Polymerase Chain Reaction).

The genetic diversity of *A. baumannii* was studied using PCR detection of the main clonal lineages and MLST (Multilocus Sequence Typing). For *S. aureus*, besides MLST, *spa* and *agr* typing methods were also applied to evaluate genetic relatedness. PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) was used to evaluate clonality between *K. oxytoca* isolated from the air environment and other strains from clinical origin.

The majority of the hospital acquired strains showed multidrug resistance, while strains from the environment of long term care facilities and animals were mainly susceptible. Among strains from human origin, reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftazidime (the last one through expression of the *mecA* gene) was detected in *S. aureus*. It was also observed nonsusceptibility to carbapenems supported by the detection of *bla_{OXA-66}* and *bla_{OXA-23}* together with *ISAba1* in *A. baumannii*, and *bla_{GES-7-type}*, *bla_{VEB-type}*, *bla_{VIM-2}* and *bla_{VIM-11}* genes in *P. aeruginosa*. These nonsusceptibility patterns constitute a source for concern because carbapenems constitute last resource antibiotics for the treatment of infections caused by these bacteria.

The identification of the same ST and *spa* types in *S. aureus* from humans and animals suggests a potential dissemination of strains between these two environments. Moreover, the molecular characterization of *S. capitis* strains from a hospital and a long term care facilities within the same region indicates a putative phenomena of transference.

Globally, long term care facilities and animal-harboring environments may act as complementary reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. Thus, a better understanding of the antibiotic resistance mechanisms and dissemination pathways in other reservoirs than human is essential to control its emergence and spread.

Keywords: multidrug resistance, MRSA, carbapenems, reservoirs.

Índice

Notas prévias	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xii
I. Introdução	1
1. Os antibióticos	1
1.1. Mecanismos e sítios de ação dos antibióticos	1
1.1.1. Síntese da parede celular	1
1.1.2. Estrutura da membrana celular	2
1.1.3. Síntese dos ácidos nucleicos	2
1.1.4. Síntese proteica	3
1.1.5. Síntese do ácido fólico	5
1.2. Resistência aos antibióticos	5
1.2.1. Mecanismos de resistência a vários antibióticos	6
1.2.2. Um problema de saúde pública	8
1.2.3. Epidemiologia da resistência aos antibióticos	9
1.2.4. Resistências aos antibióticos em isolados clínicos: pandêmicas e/ou emergentes	10
1.2.4.1. Em <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.2.4.2. Em bactérias de Gram negativo por produção de β -lactamases	12
A. Resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração por produção de ESBL	12
B. Resistência aos carbapenemes por produção de carbapenemases	13
C. Resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por produção de metalo- β -lactamases	15
1.2.4.3. Outras resistências relevantes	16
A. Por alteração de porinas	16
B. Por bombas de efluxo	16
C. Por impermeabilidade	17
1.2.5. Resistências aos antibióticos em estirpes de origem animal	17
1.2.6. Resistências aos antibióticos em estirpes de ambientes associados aos cuidados de saúde	18
1.3. Disseminação da resistência aos antibióticos por elementos genéticos móveis	19
1.3.1. Plasmídeos, sequências de inserção, sequências de inserção em regiões comuns, transposões e integrões	19
1.3.2. Transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos	20
1.3.3. Disseminação clonal	21
2. Objetivos	22
II. Material e Métodos	23

1. Isolados bacterianos.....	23
2. Determinação fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos.....	25
2.1. Teste de difusão em disco	25
2.2. Método de E-teste	28
3. Caracterização genotípica da suscetibilidade aos antibióticos	29
3.1. Extração de DNA.....	30
3.2. Detecção de genes de resistência através de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	31
3.3. Purificação de produtos de PCR	37
3.4. Sequenciação nucleotídica	38
3.5. Estudo do ambiente genético	39
4. Teste Bioquímico para detecção de carbapenemases.....	40
5. Determinação da clonalidade e diversidade genética.....	40
5.1. Linhagens clonais de <i>A. baumannii</i>	40
5.2. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	42
5.3. <i>Staphylococcus aureus</i> protein A (<i>spa</i>) typing.....	44
5.4. <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	45
5.4.1. Preparação dos discos.....	45
5.4.2. Digestão enzimática	46
5.4.3. Gel de PFGE	46
III. Resultados	48
1. Análise fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos	48
1.1. <i>Staphylococcus</i> spp.....	48
1.2. Outras bactérias de Gram positivo.....	50
1.3. <i>Acinetobacter</i> spp.....	50
1.4. <i>Pseudomonas</i> spp.....	51
1.5. Outras bactérias de Gram negativo	52
2. Identificação dos genes responsáveis pelo fenótipo de suscetibilidade diminuída	52
2.1. <i>Staphylococcus</i> spp.....	52
2.2. <i>Acinetobacter</i> spp.....	54
2.3. <i>Pseudomonas</i> spp.....	55
2.4. <i>Klebsiella oxytoca</i>	55
3. Ambiente genético do gene <i>bla_{OXA-23}</i>	56
4. Clonalidade e diversidade genética	56
4.1. Em <i>Staphylococcus aureus</i>	56
4.2. Em <i>Acinetobacter baumannii</i>	69
4.3. Em <i>Klebsiella oxytoca</i>	69
IV. Discussão	71
V. Conclusão	82
VI. Bibliografia	84
VI. Anexos	103

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema resumo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos.	17
Figura 2. Estrutura de um integrão com três CG.....	20
Figura 3. Representação dos três processos pelos quais pode ocorrer transferência horizontal de genes: conjugação, transformação e transdução.	21
Figura 4. Distribuição dos isolados clínicos por produto biológico..	23
Figura 5. Distribuição das 18 estirpes de veterinária de acordo com o animal de origem. ...	24
Figura 6. Algoritmo utilizado na caracterização fenotípica e genotípica de 48 estirpes de Gram negativo de humanos e do ambiente de lares.	29
Figura 7. Algoritmo utilizado na caracterização fenotípica e genotípica de 91 estirpes de Gram positivo de humanos, animais e do ambiente de lares.....	30
Figura 8. Representação esquemática dos genes <i>bla</i> _{OXA-23} e <i>bla</i> _{OXA-66} dos 15 isolados de <i>A. baumannii</i> e a sua associação com a sequência de inserção <i>ISAba1</i>	56
Figura 9. Distribuição dos vários ST identificados nos dois reservatórios estudados (humanos e animais).....	57
Figura 10. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que engloba o CC1, CC5, CC8, CC9, CC15, CC25 e CC97 num único grupo.....	58
Figura 11. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra CC5.	59
Figura 12. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que engloba o CC1, CC5, CC9, CC25, CC72 e CC97.....	59
Figura 13. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que engloba o CC1, CC8 e CC15.....	60
Figura 14. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC30.	60
Figura 15. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC45.	61
Figura 16. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC121	61
Figura 17. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC22.	62
Figura 18. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC398.	62
Figura 19. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC130	63
Figura 20. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC133.	63
Figura 21. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC96.	64
Figura 22. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o ST718.....	64
Figura 23. <i>Minimum spanning tree</i> com base nos vários ST e tipos de <i>spa</i> obtidos dos 75 <i>S. aureus</i> (de animais e humanos)	66
Figura 24. Resultados da técnica de PFGE usada em 10 estirpes de <i>K. oxytoca</i> de dois reservatórios distintos (lares e hospitais).....	70

Índice de Tabelas

Tabela 1. Informações sobre os <i>primers</i> utilizados para identificação de algumas das estirpes estudadas.	25
Tabela 2. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação do gene rRNA 16S.	25
Tabela 3. Principais características dos antibióticos utilizados no método de difusão em disco.	27
Tabela 4. Interpretação da suscetibilidade aos antibióticos utilizados no método de E-teste.	28
Tabela 5. Características dos <i>primers</i> usados para amplificar genes associados à resistência à meticilina (cefoxitina) em <i>Staphylococcus</i> spp.	31
Tabela 6. Características dos <i>primers</i> usados para amplificar genes associados à regulação de fatores de virulência em <i>S. aureus</i>	31
Tabela 7. Características dos <i>primers</i> usados para amplificar genes que codificam carbapenemases de classe A, B e D.	32
Tabela 8. Características dos <i>primers</i> usados para amplificar genes associados a ESBL. ..	33
Tabela 9. Características dos <i>primers</i> usados para amplificar genes associados à resistência a quinolonas mediadas por plasmídeos.	34
Tabela 10. Características dos <i>primers</i> usados para amplificar genes associados à resistência ao linezolid.	35
Tabela 11. Informações sobre os programas utilizados no termociclador para a amplificação dos vários genes descritos anteriormente.	36
Tabela 12. Combinações dos quatro <i>primers</i> usados para a pesquisa da sequência de inserção IS <i>Aba1</i> associada ao gene <i>bla</i> _{OXA-23} ou <i>bla</i> _{OXA-51-tipo}	39
Tabela 13. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação de IS <i>Aba1</i> associada aos genes <i>bla</i> _{OXA-51-tipo} ou <i>bla</i> _{OXA-23}	40
Tabela 14. Características dos <i>primers</i> utilizados nos PCR <i>multiplex</i> 1 e 2 que permitiam identificar os clones internacionais I, II e III.	41
Tabela 15. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos genes <i>ompA</i> , <i>csuE</i> e <i>bla</i> _{OXA-51-tipo}	41
Tabela 16. Critérios utilizados para interpretação dos PCR <i>multiplex</i> 1 e 2 das linhagens clonais de <i>A. baumannii</i>	42
Tabela 17. Características dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciação dos sete <i>housekeeping genes</i> (MLST) de <i>S. aureus</i>	43
Tabela 18. Características dos <i>primers</i> usados para amplificação e sequenciação dos sete <i>housekeeping genes</i> em <i>A. baumannii</i> (segundo o esquema de Oxford).	43

Tabela 19. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos sete <i>housekeeping genes</i> (MLST) de <i>S. aureus</i> .	44
Tabela 20. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos sete <i>housekeeping genes</i> (MLST) de <i>A. baumannii</i> .	44
Tabela 21. Características dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação e sequenciação da região X _R do gene <i>spa</i> .	45
Tabela 22. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação da região X _R do gene <i>spa</i> .	45
Tabela 23. Suscetibilidade aos antibióticos das 87 estirpes de <i>Staphylococcus</i> de origem humana (n=60), animal (n=17) e de ambiente de lares (n=9).	49
Tabela 24. Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes <i>Acinetobacter</i> spp. coletadas em hospitais e ambiente de lares.	51
Tabela 25. Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes de <i>Pseudomonas</i> spp. coletadas em hospitais e ambiente de lares.	52
Tabela 26. Relação entre o fenótipo e o genótipo das estirpes de <i>S. aureus</i> coletadas em humanos e animais.	54
Tabela 27. Relação entre o fenótipo e o genótipo da única estirpe de <i>S. epidermidis</i> isolada num indivíduo em ambiente hospitalar.	54
Tabela 28. Relação entre o fenótipo e o genótipo das seis <i>P. aeruginosa</i> que possuíam os genes <i>bla</i> _{VEB-tipo} , <i>bla</i> _{VIM-2/11} e <i>bla</i> _{GES-7-tipo} isoladas de humanos em ambiente hospitalar.	55
Tabela 29. Associação entre o ST e o respetivo perfil alélico para os 12 ST identificadas em 58 isolados de <i>S. aureus</i> coletados em indivíduos a nível hospitalar.	57
Tabela 30. Associação entre o ST e o respetivo perfil alélico para os 11 ST identificados em 17 estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de animais.	57
Tabela 31. Associação entre o tipo de <i>spa</i> e a respetiva sucessão de repetições para os 22 tipos de <i>spa</i> encontrados nos 58 isolados de <i>S. aureus</i> coletados de humanos em ambiente hospitalar.	65
Tabela 32. Associação entre o tipo de <i>spa</i> e a respetiva sucessão de repetições para os 11 tipos de <i>spa</i> encontrados nas 17 estirpes de <i>S. aureus</i> isolados de animais.	66
Tabela 33. Associação entre o genótipo e o fenótipo das 75 estirpes de <i>S. aureus</i> com origem em dois reservatórios distintos (humanos em hospitais e animais).	68
Tabela 34. Associação entre o genótipo e o fenótipo das 15 estirpes de <i>A. baumannii</i> coletadas em hospitais.	69

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAC (Acetiltransferases)	IgG (Imunoglobulinas G)
ABC (Adenosine Triphosphate-Binding Cassette)	IM (Integrões móveis)
Aminoacil-tRNA (Aminoacil-transfer ribonucleic acid)	IMI (<i>Imipenem-hydrolysing β-lactamases</i>)
ANT (Nucleotidiltransferases ou adeniltransferases)	IMP (<i>Imipenamase</i>)
APH (Fosfotransferases)	INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)
ATP (Adenosine triphosphate)	IS (<i>Insertion Sequences</i>)
BLAST® (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)	ISCR4 (<i>Insertion Sequence Common Region 4</i>)
BORSA (<i>Borderline oxacillin-resistant S. aureus</i>)	KPC (<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>)
BSA (<i>Bovine serum albumin</i>)	LNR-RA/IACS (Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde)
CC (Complexos Clonais)	LPS (Lipopolissacáridos)
CG (Cassetes de genes)	MATE (<i>Multidrug And Toxic Compound Extrusion</i>)
CIM (Concentrações inibitórias mínimas)	MBL (Metallo- β -lactamases)
CTX-M (Cefotaximase-Munich)	MFS (<i>Major Facilitator Superfamily</i>)
D-Ala-D-Ala (D-alanil-D-alanina)	MGE (<i>Mobile Genetic Element</i>)
D-Ala-D-Lac (D-alanil-D-lactato)	MLST (<i>Multilocus Sequence Typing</i>)
D-Ala-D-Ser (D-alanil-D-serina)	mRNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
DHF (Dihidrofolato)	MRSA (<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
DHFR (Dihidrofolato redutase)	NA (Não amplificou)
DHPS (Dihidropteroato sintetase)	NDM (<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>)
DLV (Double-Locus Variants)	NI (Não identificado)
DNA (Deoxyribonucleic acid)	NmcA (<i>Non-metallo-carbapenemase of class A</i>)
DPA (Ácido dipicolínico)	OMS (Organização Mundial de Saúde)
ESBL (<i>Extended-spectrum β-lactamases</i>)	ORF (<i>Open Reading Frame</i>)
EUA (Estados Unidos da América)	OXA (Oxacilinas)
EUCAST (<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)	PABA (<i>para-aminobenzoic acid</i>)
FIM (<i>Florence imipenemase</i>)	pb (pares de bases)
fMet (N-Formilmetionina)	PBP (<i>Penicillin-binding proteins</i>)
GES (<i>Guyana extended-spectrum-lactamase</i>)	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
GIM (<i>Germany imipenemase</i>)	PFGE (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
GISA (<i>Glycopeptide-intermediate S. aureus</i>)	PLP (Proteínas de Ligação à Penicilina)
GRD (<i>Glycopeptide resistance detection</i>)	PMQR (<i>Plasmid-mediated quinolone resistance</i>)
GTP (Guanosine triphosphate)	PTC (<i>Peptidyl transferase center</i>)
hGISA (<i>heterogeneous glycopeptide-intermediate S. aureus</i>)	RNA (<i>Ribonucleic acid</i>)
hVISA (<i>heterogenous-VISA</i>)	RND (<i>Resistance-Nodulation-Division</i>)
IC (Integrões do cromossoma)	RPP (<i>Ribosome protection proteins</i>)

rRNA (*ribosomal ribonucleic acid*)
SCCmec (*Staphylococcal cassette chromosome mec*)
SHV (*Sulfhydryl variable*)
SIM (*Seoul imipenemase*)
SLV (*Single-Locus Variants*)
SME (*Serratia marcescens enzymes*)
SMR (*Small Multidrug Resistance*)
SNP (*Single nucleotide polymorphisms*)
spa (*Staphylococcus aureus protein A*)
SPM (*Sao Paulo metallo- β -lactamase*)
ST (*Sequence Type*)
TEM (*Temoneira*)
THF (*Tetrahydrofolato*)
VEB (*Vietnamese extended-spectrum β -lactamase*)
VIH (*Vírus da Imunodeficiência Humana*)
VIM (*Verona integron-encoded MBLs*)
VISA (*Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*)

I. Introdução

1. Os antibióticos

A medicina recorre aos antibióticos para o tratamento de infeções causadas por bactérias patogénicas. Os antibióticos são agentes químicos que têm a capacidade de destruir um agente patogénico (bactericidas) ou de interferir com o seu crescimento (bacteriostáticos), sendo utilizados nas concentrações mínimas, mas eficazes, de forma a não causarem efeitos secundários adversos no homem (Tortora et al., 2010; Sommer e Dantas, 2011).

1.1. Mecanismos e sítios de ação dos antibióticos

Os antibióticos encontram-se divididos em várias classes tendo em conta os seus mecanismos de ação: glicopeptídeos, β -lactâmicos, lipopéptidos, quinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrólidos-lincosamida-estreptogramina B, tetraciclina, oxazolidinonas, sulfonamidas e trimetoprim (Hoek et al., 2011).

1.1.1. Síntese da parede celular

A síntese da parede celular, mais especificamente do peptidoglicano, é constituída por três fases. Na primeira fase são sintetizados os precursores do peptidoglicano, que na segunda fase são incorporados na molécula lípido II, responsável pelo seu transporte do citoplasma para a parede celular. Na terceira fase, aqueles precursores são integrados na rede de peptidoglicano já existente. Os antibióticos β -lactâmicos e glicopeptídeos têm como mecanismo de ação a inibição da síntese da parede celular, mas interferem com reações distintas da última fase dessa mesma síntese (Lovering et al., 2012).

O primeiro glicopeptídeo a ser utilizado em contexto clínico foi a vancomicina nos anos 50. Outro exemplo de glicopeptídeo é a teicoplanina. Estes dois antibióticos são utilizados em bactérias de Gram positivo. O alvo molecular destes compostos é a extremidade D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) do precursor do peptidoglicano da parede celular. Estes unem-se a estas extremidades, impedindo a ligação das transglicosilases ao seu substrato e evitando assim a extensão do péptido linear de glicano na parede celular, ou seja, inibem a reação de transglicosilação (Allison e Lambert, 2015).

O primeiro antibiótico β -lactâmico, a penicilina, foi descoberto nos anos 40. Os antibióticos β -lactâmicos têm um largo espetro e ligam-se, através do seu anel β -lactâmico, às enzimas transpeptidases, mais conhecidas por proteínas de ligação à penicilina (PLP ou *Penicillin-binding proteins* - PBP), existentes em bactérias de Gram negativo e de Gram positivo. Estas enzimas são responsáveis pela ligação cruzada, denominada reação de transpeptidação, entre as cadeias lineares de glicano e o peptidoglicano maduro. Assim, ao se

unirem a estas enzimas, simulando a estrutura dos resíduos D-Ala-D-Ala, os antibióticos β -lactâmicos funcionam como um substrato alternativo, não permitindo que estas participem na reação de transpeptidação, uma das últimas e principais etapas da síntese da parede celular. Como consequência, a parede celular torna-se mais fraca e as bactérias acabam por sofrer citólise ou morte causada pela pressão osmótica (efeito bactericida). Estes antibióticos incluem as penicilinas e seus derivados, as cefalosporinas, os carbapenemes, os monobactâmicos e os inibidores de β -lactamases. Os inibidores, como o ácido clavulânico, têm baixa atividade antibacteriana, mas, em associação com antibióticos β -lactâmicos, poderão aumentar a eficácia destes contra bactérias produtoras de β -lactamases. Estes inibidores podem ser reversíveis ou irreversíveis (Drawz e Bonomo, 2010; Worthington e Melander, 2013).

1.1.2. Estrutura da membrana celular

Tal como o linezolid, a daptomicina é um antibiótico de última linha, aprovado para uso humano em 2003 e utilizado em bactérias de Gram positivo. Pensa-se que a daptomicina (antibiótico lipopeptídico) tenha como alvo primário a membrana celular bacteriana, necessitando de cálcio para a penetrar. O complexo cálcio-daptomicina, após inserção na membrana celular, estimula a mudança de conformação dos lípidos, resultando na despolarização da membrana celular, permeabilização, libertação de alguns iões de potássio e morte rápida da célula. Embora o mecanismo de ação deste antibiótico ainda não esteja totalmente esclarecido, a daptomicina poderá também interferir com a biossíntese da parede celular e do ácido lipoteicoico, uma vez que para esta ocorrer é vital a organização das enzimas biossintéticas e a existência de fosfolípidos carregados negativamente. Assim, este antibiótico é também responsável pela inibição da síntese proteica, de DNA (*Deoxyribonucleic acid*) e RNA (*Ribonucleic acid*), da biossíntese da parede celular, de ácido lipoteicoico e dissipação do potencial de membrana (Bayer et al., 2013).

1.1.3. Síntese dos ácidos nucleicos

A classe das quinolonas engloba antibióticos sintéticos cujo espectro de ação depende da geração em análise. A primeira geração, da qual faz parte o ácido nalidíxico, surgiu em 1962 e atuava apenas em bactérias de Gram negativo. Nos anos 80 surgiu a segunda geração, as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina), e nos anos 90, a terceira geração (levofloxacina e moxifloxacina), ambas com um espectro que abrangia tanto bactérias de Gram negativo como de Gram positivo. A quarta e última geração de quinolonas (gemifloxacina e trovafloxacina) exerce também a sua ação sobre bactérias anaeróbicas. Estes antibióticos inibem as enzimas DNA girase e topoisomerase IV (Fàbrega et al., 2009).

A DNA girase é constituída por quatro subunidades, duas A e duas B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respetivamente. Esta enzima é responsável pelo superenrolamento negativo do DNA, dependente da hidrólise de ATP (*Adenosine triphosphate*), que, por sua vez, é necessário para processos como o alívio da tensão de torção durante a replicação, condensação do cromossoma, replicação bacteriana, iniciação da transcrição e alongação (Cheng et al., 2013).

A topoisomerase IV também possui duas subunidades A e duas B, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respetivamente. Esta enzima tem como funções: a quebra da ligação entre cromossomas recentemente replicados, para que a divisão celular possa ser completa e originar duas células filhas, cada uma com uma cópia do cromossoma; e o relaxamento de superenrolamentos positivos, tal como a DNA girase (Uivarosi, 2013).

A inibição destas enzimas origina processos bacteriostáticos como a fragmentação cromossómica, inibição da síntese de DNA e inibição do crescimento que, ao desencadearem eventos secundários, poderão conduzir a uma morte lenta da bactéria (Fàbrega et al., 2009).

1.1.4. Síntese proteica

Existe uma grande variedade de antibióticos que têm como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica, mas cada um atua numa fase distinta da tradução (iniciação, alongação e terminação). Para melhor compreender a atuação destes compostos, é importante lembrar que os ribossomas bacterianos têm na sua constituição duas subunidades: uma maior designada de 50S e outra mais pequena, a 30S. Por sua vez, a 50S é constituída por duas cadeias de RNA ribossomal (23S e 5S) e mais de 30 proteínas diferentes, enquanto a 30S tem apenas uma cadeia simples de RNA ribossomal (16S) e mais de 20 proteínas distintas (Allison e Lambert, 2015).

Os aminoglicosídeos surgiram nos anos 40, são antibióticos de largo espetro e atuam através da inibição da síntese proteica, ligando-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano. Exemplos de aminoglicosídeos: estreptomicina, gentamicina, netilmicina, tobramicina, arbecacina e amicacina (Brown e Dawson, 2015). Ao se ligarem ao RNA ribossomal 16S da subunidade 30S, estes antibióticos interferem com a fase inicial da síntese proteica, ou seja, alteram a estrutura do complexo formado por um aminoacil-tRNA (*aminoacyl-transfer RNA*) e pelo codão de mRNA (*messenger RNA*) no ribossoma. Esta alteração não resulta na inibição imediata da tradução, mas sim na incorporação errada de aminoácidos nas cadeias peptídicas, originando proteínas com possíveis alterações nas suas estruturas e funções, o que irá, por sua vez, conduzir à morte celular (efeito bactericida) (Kohanski et al., 2010).

O cloranfenicol foi isolado pela primeira vez em 1947 e é um inibidor específico da síntese proteica. Ao contrário dos aminoglicosídeos, este antibiótico liga-se à região peptidil

transferase da subunidade 50S do ribossoma, competindo com a terminação 3' do aminoacil-tRNA pelo local A desta região. Esta ação interfere com a formação de ligações peptídicas, com o rigor da tradução e com a terminação da tradução, afetando assim as fases de elongação e terminação. O seu espectro de ação engloba bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, exercendo efeitos essencialmente bacteriostáticos, embora tenha capacidade bactericida contra três das bactérias que habitualmente causam meningite: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* (Magoulas et al., 2015).

Nos anos 50 foi descoberto o primeiro macrólido, a eritromicina A (Hoek et al., 2011). Exemplos de outros macrólidos são: claritromicina e azitromicina. Os macrólidos têm um mecanismo de ação e um espectro semelhantes a outros antibióticos como as lincosamidas (lincomicina e clindamicina) e as estreptograminas B e, por isso, foram todos incluídos na mesma classe. Todos estes antibióticos inibem a síntese proteica através da sua ligação ao rRNA (*ribosomal* RNA) 23S da subunidade 50S do ribossoma bacteriano. Os macrólidos são eficazes contra bactérias de Gram positivo e de Gram negativo e têm, normalmente, ações bacteriostáticas (Pyörälä et al., 2014). Por outro lado, as lincosamidas podem ser bacteriostáticas ou bactericidas, dependendo da concentração e da espécie bacteriana, e são ativas, na sua maioria, contra bactérias de Gram positivo, mycoplasma e bactérias anaeróbicas. Por sua vez, as estreptograminas podem ser naturais (virginiamicina e pristinamicina) ou semissintéticas (quinupristina/dalfopristina) e são constituídas por, pelo menos, duas moléculas estruturalmente não relacionadas (A e B). Embora ambas as moléculas se liguem à subunidade 50S, fazem-no em locais distintos. Quando usadas em conjunto, estas podem desencadear efeitos bactericidas, no entanto, individualmente são apenas bacteriostáticas. Enquanto as estreptograminas A inibem a formação das ligações peptídicas durante a elongação e conduzem a uma alteração na conformação que aumenta a afinidade das moléculas B para o ribossoma, as estreptograminas B induzem a libertação de cadeias peptídicas incompletas da subunidade 50S (Giguère, 2013).

A primeira tetraciclina (clortetraciclina) foi isolada em 1948. Esta classe de antibióticos pode ser dividida em tetraciclinas típicas (tetraciclina e o seu derivado tigeciclina) e atípicas (anidrotetraciclina e 6-tiatetraciclina). As tetraciclinas atípicas perturbam a organização da membrana bacteriana, enquanto as tetraciclinas típicas interagem com a terminação 3' do RNA 16S associado à subunidade 30S, com proteínas acessórias e com iões de magnésio provocando a paragem da síntese proteica devido ao bloqueio da ligação do aminoacil-tRNA ao local A. Estes são antibióticos de largo espectro e têm um efeito bacteriostático (Wilson, 2009; Allison e Lambert, 2015).

O linezolide entrou na prática clínica no ano de 2000 e pertence a uma nova classe de antibióticos, as oxazolidinonas. Este antibiótico é eficaz contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas de Gram positivo, interferindo com a formação do complexo de iniciação fMet

(*N*-Formilmetionina)-tRNA-subunidade 30S-mRNA através da sua ligação ao local A do centro peptidil transferase (*Peptidyl transferase center* - PTC) da subunidade 50S do ribossoma (Tian et al., 2014).

1.1.5. Síntese do ácido fólico

O folato é vital para muitas reações necessárias ao crescimento e sobrevivência das bactérias. Os procariotas e protozoários, ao contrário dos mamíferos, têm a capacidade de sintetizar o seu próprio folato, o que faz com que este sistema de biossíntese se torne num bom alvo para agentes antimicrobianos. Na biossíntese do folato, uma molécula de pteridina e ácido p-aminobenzoico (*para-aminobenzoic acid* - PABA) são utilizados, pela dihidropteroato sintetase (DHPS), para a formação de ácido dihidropteróico, ao qual é adicionado ácido glutâmico, dando origem ao dihidrofolato (DHF) que é então reduzido para tetrahydrofolato (THF). No ciclo do folato, o THF é convertido para DHF e novamente reduzido após a reação, pela dihidrofolato redutase (DHFR), para participação em reações posteriores. A DHFR está associada simultaneamente ao ciclo do folato e à sua biossíntese, por isso, encontra-se também em células de mamíferos, no entanto, devido às suas diferenças estruturais, esta pode ser considerada como um alvo para antibióticos. Por si só, o THF é responsável pelo transporte de fragmentos de carbono que irão ser utilizados na biossíntese de bases azotadas, constituintes dos ácidos nucleicos. As sulfonamidas e o trimetoprim têm como alvo a síntese e o ciclo do folato (Capasso e Supuran, 2013; Allison e Lambert 2015).

As sulfonamidas são antibióticos sintéticos que surgiram em 1932 e, atualmente, a mais usada é o sulfametoxazol. Estas substâncias são estruturalmente semelhantes ao PABA e competem com este na ligação à DHPS, impedindo a formação do ácido dihidropteróico (Fair e Tor, 2014; Allison e Lambert 2015).

O trimetoprim foi introduzido no contexto clínico nos anos 60 e, sendo um análogo do folato, liga-se ao local ativo da enzima DHFR, inibindo-a. Esta interferência com a biossíntese e ciclo do folato resulta na paragem da síntese de DNA, RNA e proteínas. Estes antibióticos podem exibir efeitos bacteriostáticos ou bactericidas consoante o tipo de tratamento aplicado (Goldberg e Bishara, 2011; Sangurdekar et al., 2011).

1.2. Resistência aos antibióticos

Entende-se por resistência antimicrobiana, a capacidade que um organismo tem de sobreviver e de se reproduzir na presença de um determinado antibiótico (Beceiro et al., 2013). Esta resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica presente no genoma de praticamente todas as bactérias de uma mesma espécie, não é adquirida por transferência horizontal de genes e é independente da existência de pressão seletiva por parte de um antibiótico. Por outro lado, a resistência adquirida, tal como

o nome indica, é uma particularidade adquirida por bactérias previamente suscetíveis através de mutações espontâneas que ocorrem em genes localizados no cromossoma e que são posteriormente transmitidas verticalmente aquando da replicação ou através da aquisição de elementos genéticos móveis (*Mobile Genetic Element* - MGE) que possuam genes de resistência (Cox e Wright, 2013).

1.2.1. Mecanismos de resistência a vários antibióticos

Na classe dos glicopeptídeos, a resistência deve-se à produção de precursores de peptidoglicano modificados que terminam em D-Ala-D-Lac (D-alanil-D-lactato) ou D-Ala-D-Ser (D-alanil-D-serina) e que exibem pouca afinidade para estes antibióticos, não afetando, no entanto, o seu uso como substrato para a construção da parede celular. Este mecanismo de resistência é frequente no género *Enterococcus* e é codificado por operões *van* que podem estar localizados em elementos genéticos móveis ou no cromossoma. De todos os operões descritos destacam-se o *vanA* e o *vanB* devido à sua elevada frequência em isolados clínicos e associação a transposões (Kristich et al., 2014).

O mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise destes compostos, inativando-os, e podem ser codificadas por genes localizados no cromossoma, em plasmídeos ou integroes. Outros mecanismos de resistência são: PBP alteradas, o que impede que os antibióticos β -lactâmicos se liguem a estas e, consequentemente, o antibiótico torna-se menos efetivo na inibição da síntese da parede celular; redução da expressão de proteínas da membrana externa (no caso de bactérias de Gram negativo), impedindo que o antibiótico alcance as PBP da membrana plasmática interna; e bombas de efluxo capazes de fazer a extrusão do antibiótico para fora da célula (Drawz e Bonomo, 2010).

A suscetibilidade diminuída à daptomicina poderá estar associada a diversos mecanismos como, por exemplo, a acumulação progressiva de SNP (*Single nucleotide polymorphisms*) nos genes *mprF* e *walKR*, uma vez que o primeiro está envolvido na síntese e deslocação para o exterior da membrana celular de fosfolípidos carregados positivamente e o segundo participa na regulação da biossíntese do peptidoglicano e de genes associados ao metabolismo da parede celular. Entre outros mecanismos de destaque encontram-se as perturbações na estrutura da membrana celular (fluidez/rigidez), a resistência à permeabilização e despolarização da membrana, a diminuição dos pontos de ligação da superfície bacteriana com o antibiótico, o aumento da espessura da parede celular e da expressão do operão *dlt*, que está envolvido na D-alanilação de ácidos teicóicos da parede celular, originando modificações. De um modo geral, todas estas alterações afetam a capacidade de penetração da daptomicina na célula bacteriana (Bayer et al., 2013; McEvoy et al., 2013).

A resistência às quinolonas pode estar codificada no cromossoma ou em plasmídeos. A resistência codificada pelo cromossoma pode conduzir à diminuição da permeabilidade da membrana externa (devido à perda de porinas), à expressão excessiva de bombas de efluxo naturais ou a mutações nas subunidades da DNA girase e da topoisomerase IV. Na resistência codificada em plasmídeos (*Plasmid-mediated quinolone resistance* - PMQR) destaca-se: 1) o determinante *qnr*, que codifica para uma proteína que protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição pelas quinolonas; 2) uma variante *aac(6')-Ib-cr*, que tem uma substituição em dois aminoácidos e que codifica para uma aminoglicosilacetiltransferase capaz de acetilar a ciprofloxacina; 3) e o gene *qepA*, bem como, o *oqxAB* que codificam bombas de efluxo capazes de fazer a extrusão de fluoroquinolonas hidrofílicas (Hoek et al., 2011).

Os mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos podem manifestar-se através de efluxo ativo, diminuição da permeabilidade, alteração do ribossoma e inativação do antibiótico por produção de enzimas modificadoras. As três primeiras respostas podem ser desencadeadas por bombas de efluxo, mutações cromossômicas e metilases rRNA 16S, respectivamente. O mecanismo mais comum é a modificação por enzimas, que podem ser classificadas em AAC (acetiltransferases), ANT (nucleotidiltransferases ou adeniltransferases) e APH (fosfotransferases) (Ramirez e Tolmasky, 2010).

O mecanismo de resistência mais comum ao cloranfenicol é a inativação enzimática por produção de diferentes acetiltransferases codificadas pelos genes *cat*. Outros mecanismos já observados são: a inativação por produção de fosfotransferases, impermeabilidade, mutações no sítio alvo e sistemas de efluxo (Fernández et al., 2012).

Os mecanismos de resistência à classe macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B são: metilases de rRNA (mais comum), bombas de efluxo e inativação dos antibióticos por enzimas como esterases, liases, fosforilases e transferases. As metilases de rRNA são codificadas pelos genes *erm*, associados a MGE localizados no cromossoma ou em plasmídeos, e são responsáveis pela metilação de resíduos de adenina no RNA ribossomal 23S, impedindo a ligação do antibiótico à subunidade 50S do ribossoma bacteriano (Giguère, 2013; Pyörälä et al., 2014).

Existem três tipos de mecanismos de resistência às tetraciclinas: bombas de efluxo, proteínas de proteção do ribossoma (*Ribosome protection proteins* - RPP) e inativação enzimática. Os genes *tet* codificam para as bombas de efluxo, podendo ser encontrados em elementos genéticos móveis, enquanto que os genes *tetX*, *tet(34)* e *tet(37)* são responsáveis pela inativação destes antibióticos (Beceiro et al., 2013). Por sua vez, as RPP consistem em GTPases (*Guanosine triphosphate* - GTP) que se ligam ao ribossoma, alterando o sítio alvo das tetraciclinas (Wilson, 2009).

Os principais mecanismos de resistência ao linezolid são as mutações na região que codifica o domínio V do gene rRNA 23S (mais comum), a aquisição do gene *cfr*, normalmente localizado em plasmídeos, modificações nas proteínas L3, L4 e L22 do ribossoma (codificadas pelos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*, respectivamente) e mutações no promotor, mutações nonsense e missense no gene *rlmN*, em posições importantes para o funcionamento da proteína. A suscetibilidade diminuída ao linezolid causada pelo gene *cfr* deve-se à metilação da posição C8 no rRNA 23S, por uma metiltransferase. Este gene causa, frequentemente, um fenótipo de multirresistência devido à associação com outros genes de resistência a diferentes antibióticos. Por outro lado, o gene *rlmN* codifica para uma metiltransferase indígena responsável por uma metilação natural da posição C2 no rRNA 23S. Também já foram descritos mecanismos secundários de resistência a este antibiótico, nomeadamente, o aumento de espessura da parede celular e formação de biofilmes (LaMarre et al., 2011; Mendes et al., 2014; Tian et al., 2014).

A resistência às sulfonamidas é mediada pelos genes *sul1*, *sul2* e *sul3*, que codificam DHPS com diferentes conformações, e por mutações no gene cromossomal *folP*, que originam alterações na estrutura da DHPS. O gene *sul1* encontra-se, normalmente, associado a integrões de classe 1, enquanto os *sul2* e *sul3* se encontram em plasmídeos. Os genes *sul1* e *sul2* são os mais frequentes. Todas estas mudanças de conformação do alvo impedem a ligação do antibiótico (Mařka et al., 2015).

Por fim, a resistência ao trimetoprim poderá dever-se a impermeabilidade, mutações espontâneas na DHFR intrínseca, existência de uma DHFR intrínseca naturalmente insensível ao antibiótico, aumento da síntese da enzima alvo e a aquisição de genes *dfr*, que codificam DHFR resistentes e podem ser encontrados em plasmídeos (Bergmann et al., 2014).

1.2.2. Um problema de saúde pública

A resistência aos antibióticos já existia muito antes da introdução do primeiro antibiótico na prática clínica. No Novo México, na gruta de Lechuguilla, isolada de qualquer atividade antropogénica há mais de 4 milhões de anos, foram encontradas bactérias multirresistentes, assim como mecanismos de resistência nunca antes descritos para os macrólidos e daptomicina (Bhullar et al., 2012). A produção de um composto, como um antibiótico, por parte de um microrganismo ou a presença de um gene de resistência a esse mesmo composto poderão ser vantagens seletivas em meios altamente competitivos e diversificados. No entanto, a resistência aos antibióticos tem aumentado de forma preocupante nos últimos anos e algumas atividades antropogénicas têm modificado a distribuição e a quantidade de genes de resistência, alterando assim o resistoma. São exemplos destas atividades: o uso de antibióticos na pecuária, aquacultura e agricultura, o tratamento de águas residuais e efluentes agrícolas e da indústria do fabrico de antibióticos, que libertam para o meio ambi-

ente bactérias resistentes e/ou antibióticos que, embora em quantidades residuais, podem exercer pressão seletiva em bactérias já existentes na água, solo e ar. Por sua vez, estas bactérias presentes no meio ambiente podem passar os seus determinantes de resistência direta ou indiretamente para agentes patogênicos normalmente causadores de infecções em humanos e animais (Marshall e Levy, 2011; Finley et al., 2013).

Nas infecções associadas aos cuidados de saúde é cada vez mais comum isolarem-se bactérias multirresistentes. A multirresistência significa que determinada bactéria tem suscetibilidade diminuída a pelo menos um agente de três ou mais classes de antibióticos estruturalmente não relacionados (Theuretzbacher, 2013). A resistência aos antibióticos não seria um problema tão grave se houvesse uma constante produção de novos compostos capazes de substituir aqueles cujas bactérias vão adquirindo mecanismos de resistência. Mas, atualmente verifica-se um decréscimo do número de novas substâncias produzidas pela indústria farmacêutica e aprovadas pelas entidades competentes. A resistência aos antibióticos torna a produção destes compostos menos lucrativa, quando comparada com a produção de medicamentos utilizados em doenças crônicas, onde o medicamento é tomado todos os dias, durante toda a vida. É ainda de salientar que quando são produzidos e aprovados novos antibióticos, estes só deverão ser utilizados em último caso (para evitar o aparecimento de resistência) e quando os antibióticos mais antigos deixam de ser eficazes (Smith e Coast, 2013; Fair e Tor, 2014).

Num mundo sem a possibilidade de utilização de antibióticos ativos, quer para infeções comuns adquiridas na comunidade, como a pneumonia e a cistite, quer para infeções nosocomiais, como as que podem surgir em serviços neonatais e em cuidados intensivos, os tratamentos serão difíceis ou impossíveis. Doentes a receber tratamento contra o cancro e em caso de transplantes de órgãos (mais vulneráveis) poderão morrer devido a infeções. Também o tratamento preventivo para evitar infeções pós-cirúrgicas deixará de ser eficaz (OMS, 2014). A resistência aos antibióticos causa, assim, um importante crescimento da mortalidade e dos custos para o sistema de saúde (investigações adicionais, tratamentos extra, maiores períodos de permanência em hospitais e uso de medicamentos mais caros) (Smith e Coast, 2013).

1.2.3. Epidemiologia da resistência aos antibióticos

Atualmente, todos os países do mundo estão interligados através de viagens, comércio, imigração internacional, entre outros, o que facilita a propagação da resistência aos antibióticos (Rogers et al., 2011). No entanto, existe pouca informação sobre a extensão desta resistência e dos seus mecanismos nalguns locais e continentes, nomeadamente em África (OMS, 2014).

A nível mundial destacam-se alguns países que inspiram maior preocupação em relação à multirresistência. Em primeiro lugar estão os países da Ásia, América Latina e África, ou seja, países de poucos recursos económicos, grande desigualdade social, ausência de regulação em antibióticos e dos seus mercados, acesso intermitente a antibióticos, elevadas taxas de pessoas imunocomprometidas devido a infeção com o VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana), falta de condições mínimas de higiene e de água potável, que facilitam a evolução e a propagação da resistência (Theuretzbacher, 2013).

Uma outra região, os Estados Unidos, é igualmente preocupante devido a uma epidemiologia bastante diversa em relação à resistência aos antibióticos, a um elevado uso de antibióticos, acesso dificultado aos cuidados de saúde por parte de grupos mais desfavorecidos e atribuição assimétrica de rendimentos (Theuretzbacher, 2013).

De realçar ainda os países do Sul da Europa. A Europa apresenta grandes disparidades no consumo de antibióticos que parecem seguir um padrão geográfico, ou seja, os países do Sul da Europa consomem mais antibióticos do que os do Norte. Alguns estudos indicam que estas variações podem estar relacionadas com fatores culturais. Esta situação constitui um grave problema, uma vez que se considera existir uma relação direta entre o uso de antibióticos e a emergência de bactérias resistentes e multirresistentes aos mesmos (Borg, 2012).

1.2.4. Resistências aos antibióticos em isolados clínicos: pandémicas e/ou emergentes

Das diversas resistências aos antibióticos existentes a nível global, algumas têm adquirido maior importância: 1) ou por se encontrarem bastante disseminadas por todo o mundo; 2) ou por serem fonte de grande preocupação no tratamento das infeções a que estão associadas, apesar de serem recentes e pouco disseminadas. São disso exemplo: as resistências de *Staphylococcus aureus* à meticilina, à vancomicina, ao linezolid e à daptomicina e a resistência de bactérias de Gram negativo aos carbapenemes e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração por produção de β -lactamases.

1.2.4.1. Em *Staphylococcus aureus*

As bactérias *S. aureus* caracterizam-se por serem organismos esféricos, não formadores de esporos, sem mobilidade, anaeróbios facultativos, oxidase negativa, catalase positiva, intrinsecamente resistentes à ceftazidima e cujo peptidoglicano da parede celular é suscetível à lisostafina (Leclercq et al., 2013; Foster e Geoghegan, 2015). Num relatório de 2014 publicado pela OMS (Organização Mundial de Saúde), *S. aureus* foi considerado uma das nove bactérias que causam maior preocupação a nível internacional (OMS, 2014). Este microrganismo tem uma grande capacidade de disseminação, de aquisição de novas resis-

tências a antibióticos e é produtor de diversos fatores de virulência como, por exemplo, toxinas. Estes fatores de virulência são controlados pelo gene *agr*, um regulador central da transcrição, que se pode dividir em quatro grupos de especificidade e que responde à densidade celular (Reynolds e Wigneshweraraj, 2011; Foster e Geoghegan, 2015).

S. aureus é um comensal comum nos humanos, onde se encontra, frequentemente, no epitélio escamoso húmido da cavidade nasal anterior, nas mãos e nas axilas. No entanto, pode originar infeções superficiais ou invasivas, sendo, por isso, considerada uma bactéria patogénica oportunista (Foster e Geoghegan, 2015).

Uma das resistências de *S. aureus* mais comumente isolada em hospitais e comunidade, em todo o mundo, é a resistência à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – MRSA). Este tipo de suscetibilidade diminuída é, normalmente, codificada pelo gene *mecA*, que se encontra regularmente associado a MGE como as cassetes SCC*mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*) e confere resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de 5ª geração (ceftarolina e ceftobiprole). O gene *mecA* codifica para uma PBP, denominada PBP2a, com baixa afinidade para os antibióticos da classe dos β -lactâmicos (Shore et al., 2011). Já foi descrito em *S. aureus* um gene homólogo do *mecA*, o gene *mecC*, que também codifica para uma PBP modificada e está associado a elementos SCC*mec*, embora se registem, usualmente, concentrações inibitórias mínimas (CIM) baixas para a cefoxitina e oxacilina (Becker et al., 2014). A vancomicina é, normalmente, o antibiótico escolhido para o tratamento de infeções causadas por MRSA (Shore et al., 2011).

Porém, já foram descritas estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina, sendo que o primeiro registo remonta a 1997. Esta resistência pode dever-se à transferência do operão *vanA* de *Enterococcus* (mencionado em 1.2.1), mas em *S. aureus* é mais frequente a resistência intermédia à vancomicina, VISA e hVISA (*Vancomycin-intermediate S. aureus* e *heterogenous-VISA*). As populações de hVISA caracterizam-se por CIM suscetíveis, mas com subpopulações resistentes. Este fenótipo intermédio desenvolve-se aquando de uma pressão seletiva prolongada com vancomicina e parece estar relacionado com um espessamento da parede celular e um aumento de precursores de peptidoglicano não ligados. Estes precursores de peptidoglicano livres ligam-se aos antibióticos glicopeptídeos e impedem a sua interação com os precursores que se encontram na parede celular. Este fenótipo poderá não se revelar muito vantajoso em meio sem vancomicina, verificando-se, por isso, alguma instabilidade na sua ausência. As mutações mais frequentemente observadas encontram-se nos genes *walkR*, *vraRS*, *graRS* e *rpoB*. Os primeiros três genes codificam para reguladores gerais, enquanto o quarto codifica para a subunidade B da RNA polimerase (Rice, 2012; Howden et al., 2014).

Quando existe resistência à vancomicina, a daptomicina e o linezolid são as escolhas mais comuns para o combate a infecções causadas por MRSA, no entanto, a utilização de um ou outro depende do local da infecção. Todavia, já foram registadas resistências a estes dois antibióticos (mecanismos descritos em 1.2.1), embora permaneçam pouco comuns. A resistência à daptomicina surgiu poucos meses após o início da sua utilização clínica. Alguns estudos indicam que uma exposição prévia à vancomicina pode estar relacionada com o aparecimento de suscetibilidade diminuída à daptomicina, dado que o espessamento da parede celular e algumas mutações (como as localizadas no gene *walkR*), selecionadas após a falência terapêutica com vancomicina, podem provocar resistência cruzada à daptomicina (Holmes et al., 2015).

O primeiro registo de resistência ao linezolid em *Staphylococcus* ocorreu em 2001 e, atualmente, esta resistência já se encontra um pouco por todo o mundo. O mecanismo de resistência que envolve mutações no rRNA 23S pode originar vários graus de suscetibilidade diminuída ao linezolid, uma vez que o género *Staphylococcus* pode possuir várias cópias deste gene e estas podem não possuir os mesmos níveis de mutações. Também a aquisição do gene *cfr*, bem como mutações nas proteínas ribossomais L3 e L4 podem ter uma ação de sinergia com as mutações no rRNA 23S, aumentando o nível de resistência. As bactérias de *S. aureus* resistentes ao linezolid podem igualmente apresentar espessamento da parede celular (Tian et al., 2014).

1.2.4.2. Em bactérias de Gram negativo por produção de β -lactamases

Em Junho de 2015, já se encontravam descritas mais de 1500 β -lactamases (<http://www.lahey.org/studies/>), sendo, normalmente, classificadas de acordo com um dos seguintes critérios: o de Ambler, que divide as β -lactamases em classes de A a D, de acordo com a homologia das sequências de aminoácidos, e de Bush-Jacoby-Medeiros, que divide estas enzimas em grupos de 1 a 4, baseando-se em perfis de substrato e inibidor. Neste trabalho foi utilizada a classificação de Ambler. As enzimas das classes A, C e D têm no seu sítio ativo um aminoácido serina, enquanto as da classe B possuem um ou dois iões de Zn^{2+} em associação com resíduos de histidina/cisteína/aspartato no seu sítio ativo e, por isso, são denominadas metalo- β -lactamases (MBL) (Drawz e Bonomo, 2010).

A. Resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração por produção de ESBL

As ESBL (*Extended-spectrum β -lactamases*) conferem resistência às oximinocefalosporinas e aos seus análogos de 3ª e 4ª geração, antibióticos muito usados em tratamentos intravenosos de infecções graves. As primeiras ESBL, descritas nos anos 80, tiveram origem em mutações nas penicilinasas TEM (deriva do nome da paciente onde foi encontrada pela primeira vez, Temoneira) e SHV (*Sulphydryl variable*) codificadas em plasmídeos e,

posteriormente, propagaram-se em toda a família *Enterobacteriaceae*. Estas mutações provocam a alteração estrutural e a expansão do sítio ativo, permitindo a inativação das oximi-no-cefalosporinas. Seguidamente, existiu uma propagação das ESBL das famílias TEM e SHV, produzidas por isolados de *Klebsiella* spp., em doentes de unidades de cuidados intensivos e em 2000 assistiu-se a uma mudança na distribuição das ESBL, com o aumento da prevalência das ESBL da família CTX-M (*Cefotaximase-Munich*). Os genes que codificam estas enzimas, ao contrário dos anteriores, surgiram no cromossoma de *Kluyvera* spp., passando posteriormente para plasmídeos com o auxílio de uma sequência de inserção (*ISEcp1*). Cinco das variantes desta família CTX-M (grupos 1, 2, 8, 9 e 25) propagaram-se em *E. coli* e *Klebsiella* spp. num contexto clínico. Do grupo 1, a β -lactamase pandémica CTX-M-15 é a predominante na Europa, Índia, América do Norte e Médio Oriente, do grupo 9, a CTX-M-14 é a mais comum na China, Sudeste Asiático e Espanha e do grupo 2, a CTX-M-2, é a mais frequente na Argentina, Japão e Israel. A nível mundial, a Índia e a China têm taxas muito elevadas de ESBL em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., com $\geq 80\%$ e $\geq 60\%$, respetivamente. Com taxas iguais ou superiores a 30% encontram-se o Este e Sudeste da Ásia, a América Latina e Sul da Europa e com as taxas mais baixas (5 a 10%), a Austrália, Norte da Europa e América do Norte. Geralmente, os carbapenemes são o único tratamento eficaz contra bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (Livermore, 2012; OMS, 2014).

B. Resistência aos carbapenemes por produção de carbapenemases

Os carbapenemes são moléculas com um amplo espectro de atividade, mas o aumento do seu consumo para combater resistências mediadas por ESBL provocou também um aumento da resistência a estes antibióticos. O imipeneme, ertapeneme, meropeneme e doripeneme são alguns dos exemplos destes antimicrobianos. As resistências aos carbapenemes mais preocupantes a nível mundial dizem respeito a estirpes de *Acinetobacter baumannii* e da família *Enterobacteriaceae* (Nordmann et al., 2012).

A. baumannii é uma bactéria ubiqüitária naturalmente resistente a aminopenicilinas, à associação amoxicilina + ácido clavulânico, cefotaxima, cefazolina, ertapeneme, ceftriaxona, trimetoprim e fosfomicina e que causa surtos nosocomiais de elevada gravidade por todo o mundo. O mecanismo de resistência aos carbapenemes mais comum nesta espécie passa pela produção de β -lactamases de classe D (oxacilinas), sobretudo do tipo OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-51, OXA-58, OXA-143 e OXA-235, capazes de hidrolisar estes antibióticos, originando assim *A. baumannii* multirresistentes. As enzimas do tipo OXA-51 são intrínsecas, têm mais de 70 variantes e encontram-se no cromossoma bacteriano, enquanto as restantes são β -lactamases adquiridas. Porém, já foram também descritas *A. baumannii* resistentes aos carbapenemes por produção de carbapenemases do tipo GES (*Guyana ex-*

tended-spectrum-lactamase) e KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) da classe A e do tipo IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona integron-encoded MBLs*), SIM (*Seoul imipenemase*) e NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*) da classe B (Manageiro et al., 2012; Djahmi et al., 2014).

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por bactérias de Gram negativo que têm tendência para adquirir material genético através de transferência horizontal mediada por transposões ou plasmídeos. Um dos mecanismos de resistência aos carbapenemes, nesta família, inclui a aquisição de genes que codificam carbapenemases pertencentes a três classes de Ambler: A, B e D (Nordmann et al., 2012).

As enzimas da classe A são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactame e conseguem hidrolisar os carbapenemes devido a um aminoácido serina na posição 70 do seu sítio ativo que interage com o antibiótico (Nordmann et al., 2012). Nesta classe podemos encontrar as NmcA (*Non-metallo-carbapenemase of class A*), SME (*Serratia marcescens enzymes*), IMI (*Imipenem-hydrolysing β -lactamases*), GES e KPC. A enzima NmcA foi a primeira a ser descrita em *Enterobacter cloacae*. As famílias SME e IMI (na sua maioria) encontram-se codificadas no cromossoma. A enzima SME provoca casos esporádicos no Canadá e EUA (Estados Unidos da América) e a IMI, embora raramente, já foi detetada em isolados de *Enterobacter* na Croácia, França, EUA, Irlanda, Argentina e Finlândia. A família GES já foi identificada um pouco por todo o mundo, mas os casos são raros, sendo a variante GES-5 a mais frequentemente associada a *Enterobacteriaceae*. Na América do Sul, esta variante encontra-se em hospitais e meio ambiente. As β -lactamases KPC estão, normalmente, associadas a multirresistência e, por isso, são as mais relevantes da classe A em clínica. Esta família de enzimas é encontrada não só em *K. pneumoniae*, mas também em várias outras espécies de bactérias de Gram negativo e a variante KPC-2 é a mais prevalente. Estas enzimas encontram-se bastante disseminadas e já se tornaram endémicas em zonas como a Argentina, Itália, Colômbia, Grécia, Israel e, provavelmente, Polónia e algumas regiões da China (Nordmann e Poirel, 2014).

As MBL mais comuns em *Enterobacteriaceae* são IMP, VIM e, a emergente, NDM. Ao redor do Mar Mediterrâneo e no Sul da Europa prevalecem as VIM, enquanto no continente asiático, as IMP dominam. O principal reservatório das enzimas NDM em *Enterobacteriaceae* encontra-se no subcontinente indiano (hospitais e meio ambiente). Estas enzimas encontram-se comumente associadas a diversos outros determinantes de resistência e já foram descritas em diversos países da Ásia, Europa, África, América e Austrália. As bactérias *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de NDM são as mais frequentemente encontradas em infeções hospitalares e na comunidade (Walsh, 2010; Dortet et al., 2014).

A classe D é inibida por NaCl e a sua atividade de carbapenemase é fraca. Em *Enterobacteriaceae* destaca-se a OXA-48 e suas variantes, surgindo em casos esporádicos em

vários países europeus e sendo considerada endêmica na Turquia, Médio Oriente e alguns países do Norte de África. O gene *bla*_{OXA-48} encontra-se num plasmídeo considerado epidémico e que possui grande eficácia de transferência entre isolados desta família (Poirel et al., 2012).

C. Resistência de *Pseudomonas aeruginosa* por produção de metalo- β -lactamases

As bactérias da espécie *P. aeruginosa* são organismos oportunistas (Zafer et al., 2014), frequentemente associados a multirresistência (limitando os antibióticos disponíveis para tratamento) e surtos nosocomiais. *P. aeruginosa* multirresistentes são, normalmente, tratadas com recurso aos carbapenemes, aos quais já foram detetadas resistências. Embora já tenham sido registados vários tipos de mecanismos de resistência aos carbapenemes em *P. aeruginosa*, o mais importante é a síntese de carbapenemases e, entre estas, destacam-se as MBL como as mais significativas a nível clínico (Kali et al., 2013).

Com exceção dos antibióticos monobactâmicos, estas enzimas MBL de largo espectro, têm a capacidade de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos e não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases disponíveis no mercado (Kali et al., 2013). A nível mundial, as zonas que causam maior preocupação, em termos de saúde pública, devido à disseminação de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemes são: a América do Sul, Rússia e Sudoeste da Ásia. Os genes que codificam para as MBL, com exceção da SPM (*Sao Paulo metallo- β -lactamase*), têm uma grande capacidade de disseminação não só entre espécies bacterianas, mas também entre géneros, devido ao facto de se localizarem em cassetes de genes associadas a MGE. As MBL mais frequentemente descritas em *P. aeruginosa* são VIM, IMP, NDM, SPM, FIM (*Florence imipenemase*) e GIM (*Germany imipenemase*). As estirpes de *Pseudomonas* spp. produtoras de IMP e VIM têm uma distribuição mundial, mas nos cuidados de saúde predomina o gene *bla*_{VIM-2} (Zafer et al., 2014). O Brasil parece ser o único país onde as *P. aeruginosa* produtoras de SMP-1 se encontram bastante disseminadas e onde o gene *bla*_{SPM-1} pode ser encontrado em plasmídeos, associado a ISCR4 (*Insertion Sequence Common Region 4*), ou no cromossoma. Tal como as anteriores, as enzimas GIM-1 parecem estar circunscritas apenas a um país, neste caso a Alemanha. Em 2011, foi descrita pela primeira vez uma *P. aeruginosa* produtora de NDM-1 e, atualmente, já foram reportadas em vários países, como a Itália, Eslováquia, Índia e Egipto. No ano seguinte surgiu uma nova MBL, a FIM-1, isolada de uma *P. aeruginosa* multirresistente, pertencente ao clone epidémico ST235 e cujo gene que a codifica se encontrava associado a elementos ISCR19 e localizado no cromossoma (Hong et al., 2015).

1.2.4.3. Outras resistências relevantes

A. Por alteração de porinas

As porinas são proteínas responsáveis pela formação de canais que se encontram na membrana externa e permitem a entrada de compostos hidrofílicos, até determinado tamanho, para o interior da célula. Estas porinas já foram descritas em *Mycobacterium* e bactérias de Gram negativo, podendo ser divididas em várias classes. Para muitos antibióticos hidrofílicos, a principal via de entrada na célula bacteriana é através destas porinas, por isso, uma menor expressão, modificações na conformação ou condutância ou até a perda total destas proteínas irá ter influência na suscetibilidade ou resistência de um microrganismo a determinado (s) antibiótico (s). Os antibióticos β -lactâmicos, tetraciclina, fluoroquinolonas e cloranfenicol parecem ser os mais afetados por mutações que envolvem porinas. Como exemplos de algumas suscetibilidades diminuídas a antibióticos devido a alterações nas porinas temos: a perda das porinas OprD em *P. aeruginosa* resistente aos carbapenemes e, em *Enterobacter aerogenes*, a perda de condutância nas proteínas do tipo OmpF/OmpC. A primeira pode dever-se a mutações pontuais no gene que codifica as OprD e que conduzem a uma paragem prematura da tradução, a inserções ou deleções e a segunda é causada por uma mutação no *loop* 3 das proteínas OmpF/OmpC que conduz a uma suscetibilidade diminuída aos β -lactâmicos (Fernández e Hancock, 2012).

B. Por bombas de efluxo

Os genes que codificam bombas de efluxo podem ser encontrados em plasmídeos ou no cromossoma bacteriano e, por sua vez, as bombas de efluxo podem ser integradas nas famílias RND (*Resistance-Nodulation-Division*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), na superfamília ABC [*ATP (Adenosine Triphosphate)-Binding Cassette*], na família SMR (*Small Multidrug Resistance*) e na MATE (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*). A superfamília RND é encontrada apenas em bactérias de Gram negativo, enquanto as restantes podem ser encontradas tanto em bactérias de Gram negativo como de Gram positivo. Estas bombas de efluxo têm como função realizar a extrusão de várias substâncias, nomeadamente antibióticos, do citosol ou espaço periplasmático para fora das células bacterianas e a sua sobre-expressão já foi repetidamente associada a multirresistência (Sun et al., 2014).

A expressão do sistema de efluxo MexAB-OprM da família RND em *P. aeruginosa* confere um fenótipo de resistência à tetraciclina, cloranfenicol, β -lactâmicos, tigeciclina, norfloxacin, trimetoprim e sulfametoxazol. A sobre-expressão desta bomba de efluxo, assim como das bombas MexXY-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN, está associada a multirresistência em estirpes clínicas. Em *A. baumannii*, a resistência aos aminoglicosídeos e a suscetibilidade diminuída à tetraciclina, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tigeciclina (um dos antibió-

ticos de última linha para tratamento de bactérias de Gram negativo multirresistentes), eritromicina, netilmicina, trimetoprim, meropenem e brometo de etídeo é causada pela sobre-expressão da bomba de efluxo AdeABC. O aumento da expressão destes sistemas de efluxo deve-se, normalmente, a mutações em fatores de transcrição ou genes reguladores que modificam a expressão destes genes, causando a extrusão dos antibióticos para o exterior da célula bacteriana e permitindo que a bactéria sobreviva em ambientes com concentrações elevadas de antibiótico (Blair et al., 2014).

C. Por impermeabilidade

A permeabilidade seletiva das membranas bacterianas permite a aquisição de nutrientes e, simultaneamente, a proteção contra diversos compostos (Fernández e Hancock, 2012). Na secção 1.2.4.1., já foi abordada uma forma de impermeabilidade que conduz a uma suscetibilidade diminuída à vancomicina em *S. aureus* (VISA). Ainda neste âmbito podem-se destacar as mutações em genes envolvidos na biossíntese dos LPS (Lipopolissacáridos) em *P. aeruginosa*, como o P5000, que provocam modificações na estrutura destes LPS, impedindo a penetração de antibióticos, como a ceftazidima e meropenem, e causando, consequentemente, suscetibilidade diminuída a estes compostos (Alvarez-Ortega et al., 2010).

Na Figura 1 pode observar-se um esquema resumo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos descritos anteriormente.

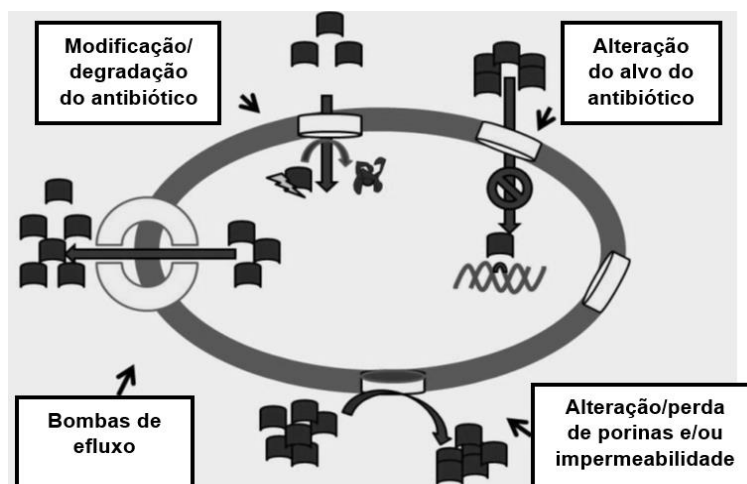


Figura 1. Esquema resumo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos (adaptada de Andersen et al., 2015).

1.2.5. Resistências aos antibióticos em estirpes de origem animal

A prevenção, tratamento de doenças e promoção do crescimento são as principais razões pelas quais os animais são expostos aos antibióticos que, por vezes, pertencem a

classes usadas também para tratamento humano (Marshall e Levy, 2011). Já foram descritas diversas estirpes, tanto de Gram positivo como de Gram negativo, com resistências aos antibióticos preocupantes não só em animais de companhia, mas também em animais selvagens e da cadeia alimentar. Entre estas encontram-se *E. coli* produtoras de ESBL e MRSA (Hunter et al., 2010). Em *S. aureus*, as resistências foram aqui descritas com maior pormenor, por se mostrarem mais relevantes no contexto deste trabalho.

Nos últimos anos, o MRSA emergiu como um problema significativo para a saúde animal, tendo sido descrito juntamente com *S. aureus* multirresistentes em 25 a 50% dos bovinos e suínos da Europa, EUA e Canadá. Portugal não é exceção, tendo já sido descrita uma prevalência de 29,6% de MRSA em amostras coletadas em cães domésticos (Coelho et al., 2011). Estão publicados vários estudos que detetaram possíveis transmissões do animal ao homem. Um exemplo desses estudos ocorreu na Coreia, onde se compararam MRSA encontrados em gado, galinhas, porcos e homem e se observou que alguns dos isolados animais eram idênticos aos isolados humanos e continham o gene *mecA*. Outro estudo demonstrou a existência de transmissão de MRSA de porcos para o suinicultor, do suinicultor para a sua família e de uma enfermeira para um doente no hospital (Marshall e Levy, 2011; OMS, 2014). Também o gene *mecC* já se encontra disseminado em animais de companhia, animais selvagens e na pecuária, não só em *S. aureus* mas também noutras espécies de *Staphylococcus*. MRSA contendo *mecC* parecem estar amplamente difundidos em animais selvagens de distintos habitats, como mamíferos e aves (Becker et al., 2014).

É de realçar ainda um estudo realizado por Wang et al., que descreveu a disseminação clonal e por transferência horizontal do gene *cfr* mediada por MGE, entre várias estirpes de *Staphylococcus* isolados em amostras provenientes de porcos, instalações de manipulação de carne e seus trabalhadores. Assim, outras espécies de *Staphylococcus*, nomeadamente as de coagulase negativa, poderão atuar como reservatórios do gene *cfr*, podendo este ser posteriormente disseminado entre as estirpes de *S. aureus* (Wang et al., 2015).

1.2.6. Resistências aos antibióticos em estirpes de ambientes associados aos cuidados de saúde

Na Europa, a necessidade de cuidados de saúde continuados está a aumentar, uma vez que possuímos cada vez mais uma população envelhecida. Neste contexto, os lares tornaram-se um ambiente facilitador da disseminação da resistência aos antibióticos devido aos cuidados de saúde que se prestam aos mais idosos. Os residentes em lares têm uma maior propensão para a aquisição de doenças infecciosas devido não só à presença de doenças crónicas ou ao uso de dispositivos invasivos (tubos de alimentação e cateteres urinários), mas também devido ao facto de viverem em grande proximidade uns com os outros e com pessoal e equipamento afeto aos cuidados continuados. Esta maior prevalência de in-

feções pode conduzir a um consumo substancial de antibióticos que, por sua vez, aumenta a probabilidade do aparecimento de resistências. A acrescentar ainda a este problema encontra-se o facto de alguns destes antibióticos não serem prescritos adequadamente, contribuindo assim para a possibilidade da comunidade (lares e outros) servirem como reservatórios de bactérias resistentes aos antibióticos. Existem variações na prescrição de antibióticos em lares de diferentes países, mas também entre lares do mesmo país, sendo os β -lactâmicos os que aparentam ser os mais prescritos (McClean et al., 2011; Buul et al., 2012). Alguns estudos indicam a prevalência de MRSA (Gruber et al., 2013), seguida por *Enterococcus* resistentes à vancomicina (Min et al., 2015) e *E. coli* produtoras de ESBL (Dhanji et al., 2011) nestas instalações prestadoras de cuidados continuados.

1.3. Disseminação da resistência aos antibióticos por elementos genéticos móveis

Um MGE pode ser definido como um qualquer segmento de DNA que tem a capacidade de translocação de uma região do genoma para outra ou até entre genomas (da mesma espécie ou de espécies diferentes). Estes elementos podem ter, na sua constituição, genes de resistência a antibióticos (Hoek et al., 2011).

1.3.1. Plasmídeos, sequências de inserção, sequências de inserção em regiões comuns, transposões e integrões

Nas infeções adquiridas na comunidade e nos hospitais, o principal mecanismo de aquisição de resistência é a transferência horizontal de genes de resistência localizados em plasmídeos. Estes MGE consistem em DNA extracromossómico, com replicação autónoma e possuem, na sua maioria, uma origem de replicação, genes que codificam funções de replicação, uma origem de transferência e genes que codificam funções que permitem a sua transferência para outro hospedeiro através do fenómeno de conjugação (plasmídeos conjugativos). Um exemplo de disseminação causada por plasmídeos é a do gene *bla*_{NDM-1}, que é frequentemente encontrado no plasmídeo IncA/C, o qual consegue replicar em diversos hospedeiros, nomeadamente em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. e codifica vários determinantes de resistência relacionados com os aminoglicosídeos, sulfonamidas, trimetoprim e cloranfenicol (Smillie et al., 2010; Carattoli, 2013).

As sequências de inserção (*Insertion Sequences* - IS) são dos MGE mais simples, codificando apenas para informação necessária à transposição do elemento. Assim, estes elementos não codificam para nenhum tipo de resistência mas, através de inserção direta ou efeito polar na transcrição de genes próximos, podem alterar a expressão de genes. O ISA-*ba* é um exemplo de uma IS frequentemente associada a genes que codificam para β -lactamases da classe D. Esta IS é responsável pelo aumento da expressão dos genes

bla_{OXA} quando se encontra a montante destes, conferindo assim resistência aos carbapenemes (Alibayov et al., 2014; Evans e Amyes, 2014).

As ISCR replicam através do mecanismo de círculo rolante e estão delimitadas por uma *ori/S* (origem de replicação, indispensável para a transposição) e uma *ter/S* (sequência de terminação). Os elementos ISCR têm a capacidade de mobilização de fragmentos de DNA adjacentes à *ter/S*, sendo, por isso, importantes na propagação de genes de resistência a antibióticos como os que codificam para ESBL (Schleinitz et al., 2010).

Os transposões são semelhantes às IS mas, ao contrário destas, contêm genes adicionais que podem estar relacionados com a resistência aos antibióticos. Estes MGE podem ser responsáveis por translocações, deleções e inserções no genoma do seu hospedeiro (Toleman e Walsh, 2011). O Tn554 é o exemplo de um transposão, em *Staphylococcus*, que contém genes de resistência à classe dos macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B, eritromicina e espectinomicina (Alibayov et al., 2014).

Os integrões são elementos com a capacidade de adquirir e expressar genes (por exemplo, de resistência a antibióticos) contidos em cassetes de genes (CG). Um integrão é constituído por um gene *intl*, que codifica para a integrase Intl responsável pela recombinação entre a CG e o sítio de recombinação *attI* do integrão, e por um promotor *Pc*, responsável pela expressão da CG após recombinação (que é reversível). As CG são estruturas simples normalmente só com uma ORF (*Open Reading Frame*) e com um local de recombinação *attC* (Figura 2). Conhecem-se, atualmente, dois grandes grupos de integrões: os do cromossoma (IC) e os móveis (IM). Os IM localizam-se em transposões e plasmídeos e podem ser divididos em cinco classes. Os integrões de classe 1 já foram encontrados não só em bactérias de Gram negativo multirresistentes e de Gram positivo em contexto clínico, mas também em bactérias comensais e patogénicas de animais de companhia e animais da cadeia alimentar, assim como em bactérias patogénicas de plantas (Gillings, 2014).

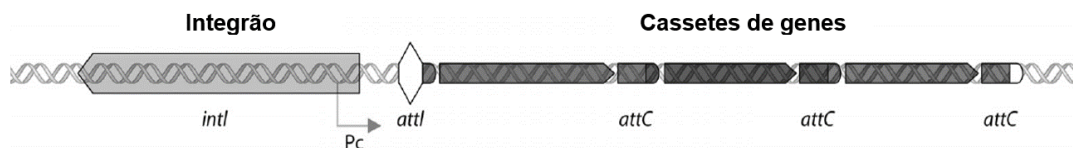


Figura 2. Estrutura de um integrão com três CG. Pode observar-se o gene *intl*, o promotor *Pc* e o sítio de recombinação do integrão (*attI*). Nas CG pode observar-se o sítio de recombinação *attC* (adaptada de Gillings, 2014).

1.3.2. Transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos

A transferência horizontal de genes em bactérias permite a aquisição de características de diferentes organismos, independentemente da sua filogenia, e uma aceleração da

evolução destes organismos, podendo ocorrer através de três processos: conjugação, transformação e transdução (Juhas, 2013; Fournier et al., 2015).

A conjugação é um processo no qual é necessário existir contacto direto entre células bacterianas para ocorrer transferência de material genético. Em bactérias de Gram positivo, esse contacto existe através da produção de moléculas de adesão à superfície da célula. Por outro lado, a síntese de um *pilus* codificado no plasmídeo de uma célula dadora permite o contacto com a célula recetora, em bactérias de Gram negativo (Figura 3). Estabelecida a conexão entre as duas bactérias, o plasmídeo replica e uma cadeia simples é transferida para a bactéria recetora, onde é, posteriormente, sintetizada a cadeia complementar (Tortora et al., 2010).

A transformação ocorre em bactérias de Gram negativo e de Gram positivo e, durante este processo, as bactérias recetoras recebem DNA livre do ambiente que pode ser incorporado no seu genoma, por recombinação homóloga ou transposição, ou pode possuir a capacidade de se replicar autonomamente como, por exemplo, os plasmídeos (Figura 3). As bactérias recetoras são então denominadas competentes. Este processo de transformação ocorre naturalmente em algumas espécies de *Haemophilus*, *Bacillus*, *Neisseria* e *Streptococcus*, entre outras (Burton e Dubnau, 2010).

Finalmente, o processo de transdução envolve a introdução de DNA da bactéria nos bacteriófagos, em substituição do DNA do bacteriófago. Quando este bacteriófago infeta um novo hospedeiro, injeta o DNA bacteriano numa nova bactéria (recetora) (Figura 3). Alguns estudos já permitiram concluir que genes de resistência a antibióticos ou até elementos genéticos móveis inteiros podem ser transferidos através de transdução (Hoek et al., 2011).

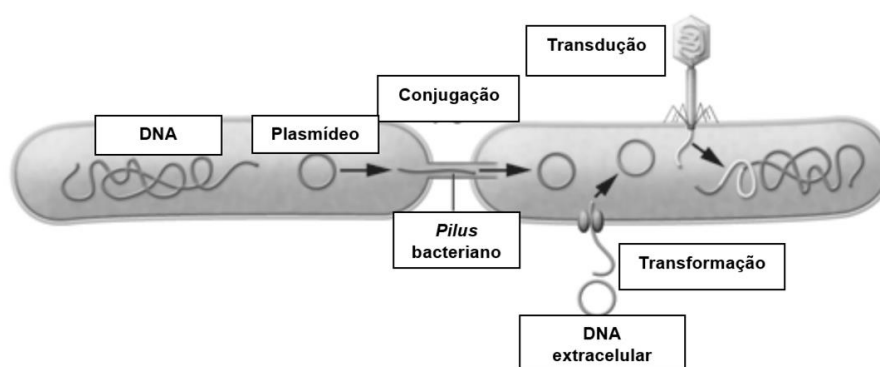


Figura 3. Representação dos três processos pelos quais pode ocorrer transferência horizontal de genes: conjugação, transformação e transdução (adaptada de Modi et al., 2014).

1.3.3. Disseminação clonal

Para além da aquisição de genes de resistência, uma bactéria pode tornar-se resistente por mutações que ocorrem no seu genoma e que são transmitidas à geração seguinte,

denominando-se este processo de clonalidade, ou seja, uma transferência vertical de genes, assexuada (Tibayrenc e Ayala, 2012). Alguns exemplos de disseminação clonal de resistência são: disseminação clonal de MRSA em pacientes e ambiente hospitalar em três hospitais de Teerão (Javidnia et al., 2013), disseminação clonal de *Staphylococcus capitis* resistente ao linezolid num hospital da China (Zhou et al., 2015) e surtos clonais causados por *A. baumannii* resistentes aos carbapenemes por produção de OXA-23 no Brasil, Bulgária, Iraque, China, Polinésia francesa e Afeganistão (Mugnier et al., 2010).

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral a caracterização de mecanismos de resistência aos antibióticos em estirpes com origem em ambientes diversos, como hospitais, ambientes associados aos cuidados de saúde continuados e animais, assim como da sua disseminação por elementos genéticos móveis. Pretendeu-se especificamente:

- ❖ Identificar quais as resistências aos antibióticos existentes em bactérias isoladas de indivíduos a nível hospitalar, noutras instituições prestadoras de cuidados de saúde (exemplo: lares) e em animais;
- ❖ Identificar quais os principais genes que poderão estar implicados nos mecanismos de resistência identificados e sua disseminação (associação a MGE, clonalidade e diversidade);
- ❖ Compreender a circulação de genes de resistência em diferentes reservatórios (resistoma).

II. Material e Métodos

1. Isolados bacterianos

Para o presente trabalho foram estudadas 139 estirpes bacterianas pertencentes à coleção do Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Destas, 91 foram recolhidas em hospitais nacionais, 30 em lares da zona de Lisboa próximos de hospitais e 18 pertenciam à área da veterinária.

Foram estudados 30 isolados de Gram negativo [*A. baumannii* (n=15) e *P. aeruginosa* (n=15)] e 61 de Gram positivo [*Exiguobacterium acetylicum* (n=1), *S. aureus* (n=58), *S. capitis* (n=1) e *Staphylococcus epidermidis* (n=1)] provenientes de 35 hospitais, diversos produtos biológicos (Figura 4); foram adquiridos na comunidade, no hospital ou tinham origem desconhecida.

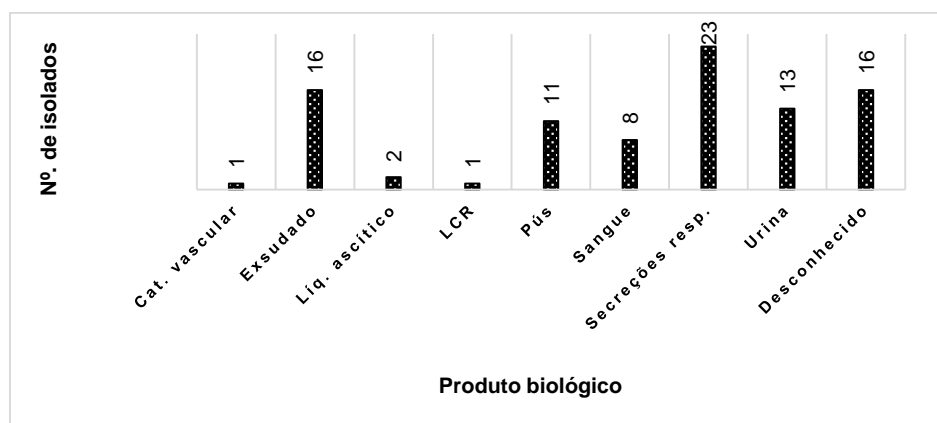


Figura 4. Distribuição dos isolados clínicos por produto biológico. Cat. vascular = cateter vascular; Líq. ascítico = líquido ascítico; LCR = líquido cefalorraquidiano; Secreções resp. = secreções respiratórias.

As 30 estirpes dos lares são constituídas por 18 bactérias de Gram negativo [*Acinetobacter haemolyticus* (n=1), *Acinetobacter lwoffii* (n=1), *Acinetobacter junii* (n=1), *Acinetobacter pittii* (n=2), *Klebsiella oxytoca* (n=1), *Pantoea* spp. (n=4), *Pseudomonas fluorescens* (n=1), *Pseudomonas oryzae* (n=3), *Pseudomonas putida* (n=3) e *Sphingomonas paucimobilis* (n=1)] e 12 de Gram positivo [*Micrococcus luteus* (n=3), *S. capitis* (n=1), *Staphylococcus capitis/caprae/warneri* (n=1), *S. epidermidis* (n=2), *Staphylococcus haemolyticus* (n=3), *Staphylococcus hominis* (n=1) e *Staphylococcus xylosus* (n=1)] recolhidas em quartos, salas de estar e exterior de 4 lares distintos de Lisboa. Estas estirpes tiveram origem em amostras de ar colhidas pela Unidade de Ar e Saúde Ocupacional do Departamento de Saúde Ambiental do INSA, no âmbito da análise da qualidade do ar interior destes lares. O método de amostragem consistiu na utilização do amostrador de microrganismos em sus-

pensão na atmosfera, MAS-100 (Merck), com os meios TSA (*Trypticase Soy Agar*, para bactérias no geral) com cicloheximida (para inibição do crescimento de fungos) ou *MacConkey* agar (para bactérias de Gram negativo), para a colheita de um volume de ar de 250 L em cada divisão estudada. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C, as colónias foram contadas e foram enviadas para o LNR-RA/IACS.

Na área da veterinária foram analisadas 18 estirpes de Gram positivo [*S. aureus* (n=17) e *Staphylococcus simiae* (n=1)] provenientes de diferentes animais (Figura 5).

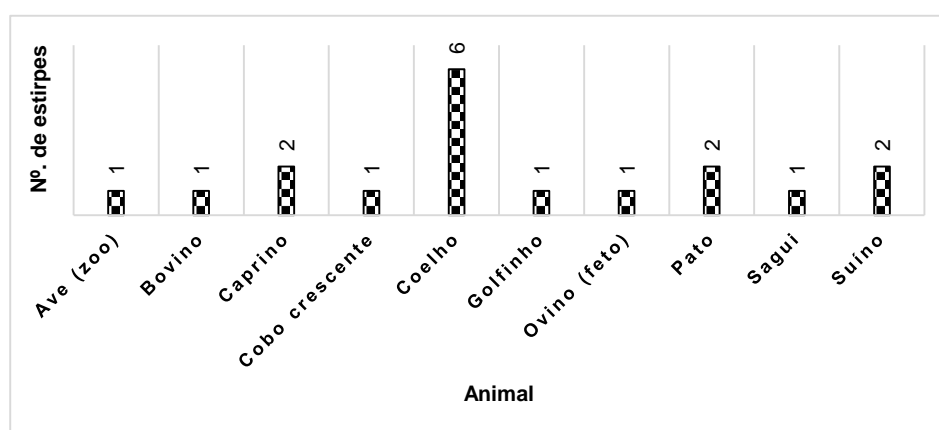


Figura 5. Distribuição das 18 estirpes de veterinária de acordo com o animal de origem.

Todas as estirpes que fizeram parte deste estudo foram manipuladas numa câmara de fluxo laminar (*Heraeus, Hera Safe*). Sempre que necessário, foi realizada a identificação das estirpes das três origens (hospital, lar e veterinária) através do aparelho de VITEK® 2 ou da amplificação por técnica de PCR seguida de sequenciação do gene rRNA 16S. Este gene é altamente conservado em praticamente todas as bactérias, contendo apenas algumas regiões variáveis específicas de determinada espécie ou género, permitindo assim uma identificação da bactéria por comparação com sequências já descritas (Jenkins et al., 2012). Para a amplificação deste gene foi realizada uma mistura de reação, numa câmara de fluxo laminar (*Holten Laminair PCR 2002*), com os seguintes constituintes: tampão (1×, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1×, *Qiagen*), primers específicos (Tabela 1), *Taq polimerase* (0,5 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl. O passo seguinte consistiu na adição de 1 µl de DNA a esta mistura que foi, posteriormente, colocada num termociclador (*C1000™ Thermal Cycler BioRad*) com um programa específico (Tabela 2). Finalizado o programa, os resultados foram observados através de uma eletroforese em gel de agarose (descrita na secção 3.2.), purificados (ver secção 3.3.) e sequenciados (ver secção 3.4.).

Tabela 1. Informações sobre os *primers* utilizados para identificação de algumas das estirpes estudadas.

Designação do <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	Concentração final (µM)	Gene	Tamanho do fragmento	Referência
8F ^a	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	0,4	rRNA 16S	Variável (≈ 1500 pb)	Srivastava et al., 2008 Piterina et al., 2010
1492R ^a	GGTTACCTTGTTACGACTT				

^a*Primers* utilizados também na sequenciação.

Tabela 2. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação do gene rRNA 16S.

Processo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	7'
	94	1' 30" } x 30 ciclos
Hibridação	54,4	
Extensão	72	
	72	10'

2. Determinação fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos

2.1. Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco permitiu avaliar a suscetibilidade a diversos antibióticos das 139 estirpes bacterianas. Para tal, foram obtidas culturas puras com colónias isoladas em meio de gelose simples, tendo sido posteriormente repicadas 2 a 5 colónias para suspender em 2,5 ml de soro fisiológico estéril e obter uma turvação de aproximadamente 0,5 *McFarland* (*DEN-1B McFarland Densitometer Grant-bio*). De seguida, esta suspensão foi inoculada por espalhamento em placas quadradas (120 mm x 120 mm) de meio de *Mueller-Hinton* agar, utilizando uma zaragatoa estéril.

Para os géneros *Exiguobacterium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* foi semeada uma placa onde foram colocados 3 antibióticos em disco (*BioRad*) com o auxílio de uma pinça: cefoxitina, ciprofloxacina e linezolid. Também para os géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas* foi semeada uma placa e foram colocados, com o auxílio de um dispensador automático (*BioRad*), 15 discos (*BioRad*) com os seguintes antibióticos: ciprofloxacina, tobramicina, gentamicina, amicacina, ceftazidima, ceftazidima + ácido clavulânico, cefotaxima, cefotaxima + ácido clavulânico, cefepime, meropeneme, ertapeneme, doripeneme, imipeneme e piperacilina + tazobactame. Por outro lado, para os géneros *Pantoea* e *Klebsiella* foram semeadas duas placas, uma com 16 antibióticos e a outra com 14 antibióticos em disco (*BioRad*), colocados também com um dispensador automático (*BioRad*): amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, ceftazidima + ácido clavulânico, aztreonam, cefotaxima, cefotaxima + ácido clavulânico, cefpodoxima, cefepime, meropeneme,

ertapeneme, doripeneme, imipeneme, ceftazidima, piperacilina + tazobactame e cefoxitina na 1ª placa; e ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, trimetoprim + sulfametoxazol, tobramicina, gentamicina, ampicilina, piperacilina, ticarcilina + ácido clavulânico, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e ceftaroline na 2ª placa (Tabela 3).

Na placa dos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas*, assim como na 1ª placa dos gêneros *Pantoea* e *Klebsiella* foram adicionados mais discos com o objetivo de pesquisar e prever mecanismos de resistência específicos: um disco branco com 3,5 µl de uma solução de ácido bórico 0,5 M (300 µg) para pesquisa de carbapenemases de classe A (o teste é positivo quando existe sinergia entre o disco com ácido bórico e os carbapenemes), um disco de imipeneme com 5 µl de uma solução de ácido dipicolínico (DPA) de 200 mg/ml (1000 µg) para pesquisa de MBL (o teste é positivo na presença de sinergia entre IMP + DPA e carbapenemes e/ou uma diferença ≥ 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição de IMP e IMP + DPA) e um disco de amoxicilina com ácido clavulânico e 4,2 µl de uma solução de cloxacilina 0,25 M (500 µg) para pesquisa de β -lactamases de classe C (o teste é positivo na presença de uma diferença ≥ 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição de AMC e AMC + CLOX). Na 1ª placa dos gêneros *Pantoea* e *Klebsiella* foi ainda acrescentado um disco em branco com 4,2 µl da solução de cloxacilina 0,25 M também para pesquisa de β -lactamases de classe C (o teste é positivo na presença de sinergia entre o disco com CLOX e FOX e/ou CAZ) e um disco de temocilina para detectar a produção de OXA-48 (o teste é positivo quando não existe halo de inibição) (Tabela 3). Todos estes discos foram adicionados com uma pinça estéril e as suas posições podem ser observadas nas Figuras a e b do Anexo i.

As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas e os diâmetros dos halos de inibição de cada antibiótico, assim como as sinergias ou antagonismos, foram lidos com o auxílio do ADAGIO™ *Antimicrobial Susceptibility Testing System* (BioRad). Os resultados foram interpretados de acordo com as normas EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2015); no entanto, uma vez que os gêneros *Exiguobacterium* e *Micrococcus* não se encontravam nestas normas, foram utilizados os valores de *S. aureus* para determinação da suscetibilidade e para o gênero *Sphingomonas* foram utilizados os valores de *Pseudomonas*.

Tabela 3. Principais características dos antibióticos utilizados no método de difusão em disco.

Classe do antibiótico	Antibiótico	Sigla	Carga do disco (µg)	Diâmetros críticos (mm)
β-lactâmicos	Cefoxitina	FOX	30	S≥22/R<22 ^a S≥25/R<25 ^b S≥19/R<19 ^c
	Cefotaxima	CTX	30	-
	Ceftazidima	CAZ	10	S≥22/R<19 ^c S≥16/R<16 ^d
			30	-
	Cefepime	FEP	30	S≥24/R<21 ^c S≥19/R<19 ^d
	Doripeneme	DOR	10	S≥24/R<21 ^c S≥25/R<22 ^d S≥23/R<20 ^e
	Imipeneme	IMP	10	S≥22/R<16 ^c S≥20/R<17 ^d S≥23/R<17 ^e
	Meropeneme	MEM	10	S≥22/R<16 ^c S≥24/R<18 ^d S≥21/R<15 ^e
	Ertapeneme	ERT	10	S≥25/R<22 ^c
	Amoxicilina	AMX	25	-
	Ampicilina	AMP	10	S≥14/R<14 ^c
	Aztreonam	ATM	30	S≥24/R<21 ^c
	Temocilina	TEM	30	-
	Cefpodoxima	CPD	10	S≥21/R<21 ^c
	Piperacilina	PIP	30	S≥20/R<17 ^c
	Cefuroxima	CXM	30	S≥18/R<18 ^c
	Ceftriaxona	CRO	30	S≥23/R<20 ^c
	Ceftaroline	CPT	5	S≥23/R<23 ^c
Associação β-lactâmicos + inibidores de β-lactamases	Ceftazidima + ácido clavulânico	CCA	30+10	-
	Cefotaxima + ácido clavulânico	CCT	30+10	-
	Piperacilina + tazobactame	TPZ	30+6	S≥20/R<17 ^c S≥18/R<18 ^d
	Ticarcilina + ácido clavulânico	TCC	75+10	S≥23/R<23 ^c
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5	S≥20/R<20 ^{a,b} S≥22/R<19 ^c S≥25/R<22 ^d S≥21/R<21 ^e
	Ofloxacina	OFX	5	S≥22/R<19 ^c
	Levofloxacina	LEV	5	S≥22/R<19 ^c
Aminoglicosídeos	Tobramicina	TMN	10	S≥17/R<14 ^c S≥16/R<16 ^d S≥17/R<17 ^e
	Gentamicina	GEN	10	S≥17/R<14 ^c S≥15/R<15 ^d S≥17/R<17 ^e
	Amicacina	AN	30	S≥18/R<15 ^{c,d,e}
Oxazolidinonas	Linezolide	LNZ	10	S≥19/R<19 ^{a,b}
Trimetoprim + sulfonamidas	Trimetoprim + sulfametoxazol	SXT	1,25+23,75	S≥16/R<13 ^c

^aDiâmetros críticos para *S. aureus*. ^bDiâmetros críticos para *Staphylococcus* de coagulase negativa. ^cDiâmetros críticos para *Enterobacteriaceae*. ^dDiâmetros críticos para *Pseudomonas* spp. ^eDiâmetros críticos para *Acinetobacter* spp. S = Suscetibilidade; R = Resistência (os valores entre ambos são considerados suscetibilidade intermédia).

2.2. Método de E-teste

O método de E-teste foi utilizado para completar a avaliação da suscetibilidade aos antibióticos nas estirpes de Gram positivo. Na mesma placa onde se encontravam os 3 discos de antibiótico (ver secção 2.1.) foram colocadas, com uma pinça estéril, 3 tiras de E-teste® (*BioMérieux*) com um gradiente de concentração de 0,016 a 256 µg/ml dos seguintes antibióticos: daptomicina, teicoplanina e vancomicina. Após uma incubação a 37°C durante 18 horas, os resultados foram interpretados de acordo com as normas EUCAST (2015; Tabela 4).

Tabela 4. Interpretação da suscetibilidade aos antibióticos utilizados no método de E-teste.

Classe do antibiótico	Antibiótico	Sigla	Gradiente de concentração (µg/ml)	Valores críticos (mg/l)
Lipopéptido	Daptomicina	DPC	0,016-256	S≤1/R>1 ^{a,b}
Glicopeptídeo	Teicoplanina	TP	0,016-256	S≤2/R>2 ^a S≤4/R>4 ^b
	Vancomicina	VA	0,016-256	S≤2/R>2 ^a S≤4/R>4 ^b

^aValores para *S. aureus*. ^bValores para *Staphylococcus* de coagulase negativa. S = Suscetibilidade; R = Resistência.

Este método foi também utilizado para a pesquisa de isolados hGISA (*heterogeneous glycopeptide-intermediate S. aureus*)/GISA e hGISE (*heterogeneous glycopeptide-intermediate S. epidermidis*)/GISE (denominado teste GRD – *Glycopeptide resistance detection*) em 10 estirpes de *S. aureus* e uma estirpe de *S. epidermidis*, selecionadas devido aos valores críticos de teicoplanina e vancomicina indicarem uma suscetibilidade diminuída a estes antibióticos ou estarem muito próximos dos valores limite. Para tal, foi preparada uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 *McFarland*, como descrito na secção 2.1. (com a exceção do uso de caldo de *Mueller-Hinton* em lugar de soro fisiológico estéril); esta foi, posteriormente, semeada, com o auxílio de uma zaragatoa estéril, por espalhamento em placas redondas (90 mm de diâmetro) de meio de *Mueller-Hinton* agar com 5% de sangue. Seguidamente, foi adicionada uma tira de E-teste® (*BioMérieux*) por placa, que possuía numa extremidade um gradiente de concentração de 0,5 a 32 µg/ml de vancomicina e na outra extremidade um gradiente com os mesmos valores, mas com o antibiótico teicoplanina. Após 24 horas de incubação a 37°C foi realizada uma primeira leitura dos resultados, a qual foi confirmada por uma segunda leitura às 48 horas de incubação, para detetar resistência tardia. Os resultados foram interpretados de acordo com as seguintes instruções: o teste foi positivo para hGISA/hGISE ou GISA/GISE quando os valores de vancomicina ou de teicoplanina foram iguais ou superiores a 8 µg/ml; adicionalmente, se os valores de vancomicina *standard* (ver início da secção 2.2.) fossem iguais ou superiores a 4 µg/ml estávamos na

presença de um GISA/GISE, enquanto que se fossem inferiores a 4 µg/ml estávamos na presença de um hGISA/hGISE.

3. Caracterização genotípica da suscetibilidade aos antibióticos

A interpretação dos resultados do teste de difusão em disco e do E-teste permitiram orientar a pesquisa de genes de resistência por PCR (Figuras 6 e 7). Para ser possível a realização desta técnica foi essencial uma adequada extração de DNA.

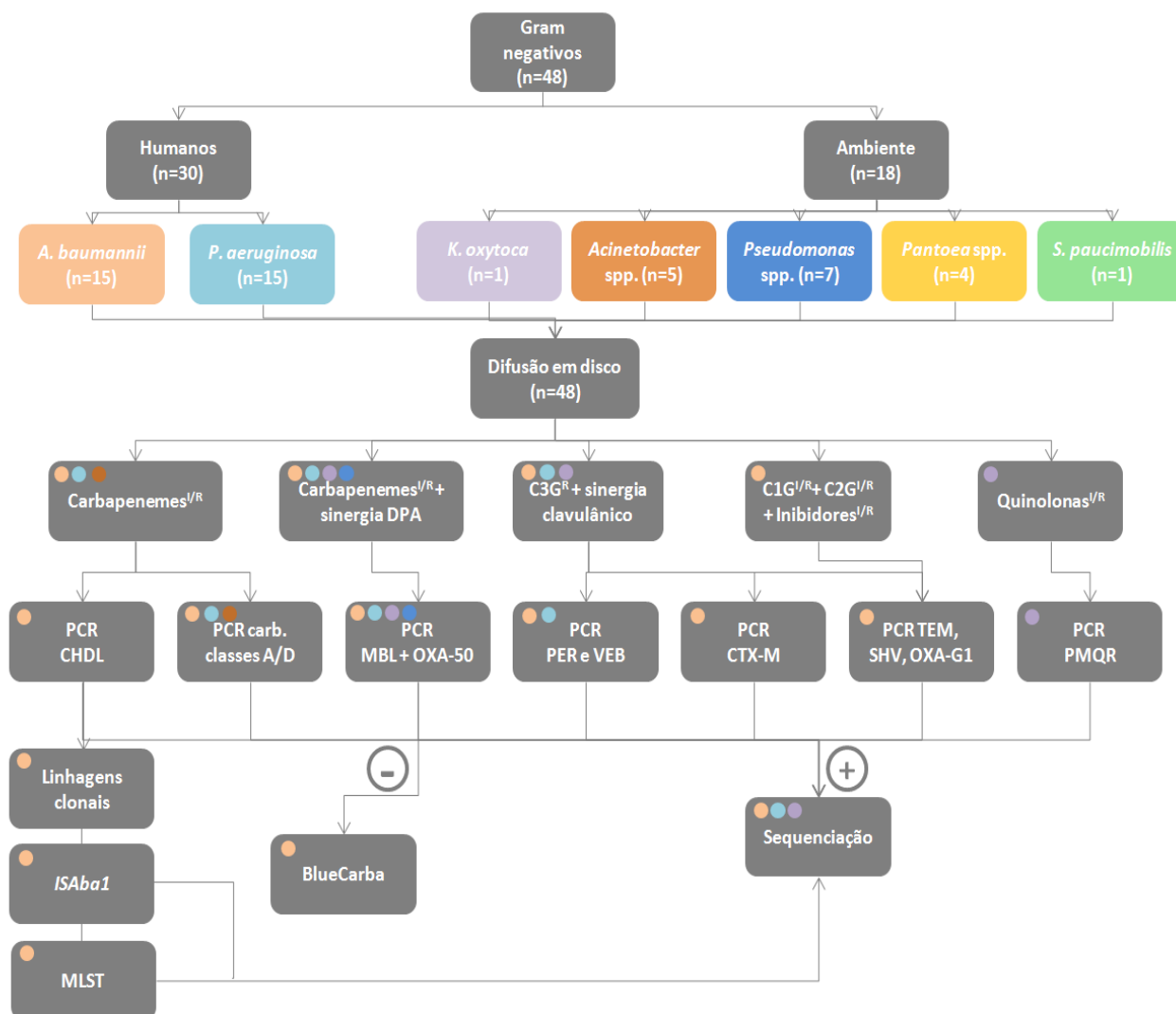


Figura 6. Algoritmo utilizado na caracterização fenotípica e genotípica de 48 estirpes de Gram negativo de humanos e do ambiente de lares. Carbapenemes^{I/R} + sinergia DPA = estirpes não suscetíveis aos carbapenemes que apresentam sinergia com o ácido dipicolínico (DPA); C3G^{I/R} + sinergia clavulânico = estirpes não suscetíveis às cefalosporinas de 3^a geração que apresentam sinergia com ácido clavulânico; C1G^{I/R} + C2G^{I/R} + Inibidores^{I/R} = estirpes não suscetíveis às cefalosporinas de 1^a e 2^a geração e às combinações β-lactâmico com inibidor de β-lactamase; PCR CHDL = PCR para a detecção de genes que codificam carbapenemases de classe D; PCR carb. classe A/D = PCR para a detecção de genes que codificam carbapenemases de classe A e D; PCR MBL + OXA-50 = PCR para a detecção de genes que codificam metalo β-lactamases e OXA-50; PCR PMQR = PCR para a detecção de genes que codificam genes plasmídicos de resistência às quinolonas.

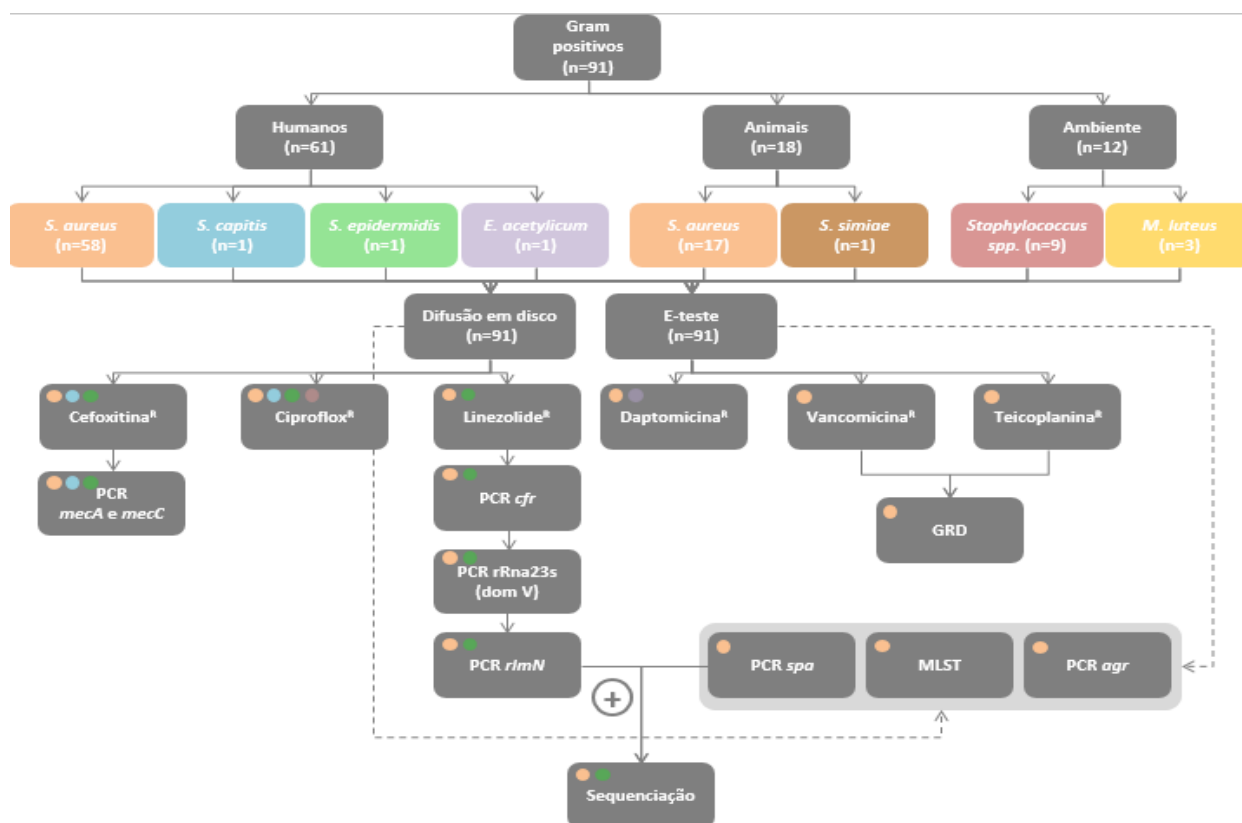


Figura 7. Algoritmo utilizado na caracterização fenotípica e genotípica de 91 estirpes de Gram positivo de humanos, animais e do ambiente de lares. Ciprofloxacina^R = Resistência à ciprofloxacina.

3.1. Extração de DNA

Para as bactérias do género *Staphylococcus*, a extração de DNA foi realizada com recurso à lisostafina (*Sigma-Aldrich*). Este processo consistiu em suspender 4 a 5 colónias (provenientes de uma cultura pura obtida em meio de gelose simples, após 18 horas de incubação a 37°C) em 45 µl de água bidestilada estéril, seguida da adição de 5 µl de lisostafina (1 mg/ml). A lisostafina é uma enzima com a capacidade de quebrar as ligações cruzadas do peptidoglicano na parede celular das espécies de *Staphylococcus*, provocando a lise destas células (Sabala et al., 2014). Após uma incubação de 10 minutos a 37°C (em banho-maria), adicionaram-se 45 µl de água bidestilada estéril, 150 µl de Tris-HCL (0,1 M a pH 8) e 5 µl de proteinase K (2 mg/ml). Esta mistura foi incubada durante 10 minutos a 60°C e, posteriormente, durante 5 minutos a 100°C (em banho-maria). Finalizado o tempo de incubação, o tubo com o DNA foi congelado a -20°C.

Para as restantes bactérias, a extração foi realizada através do método de fervura. Este método consistiu na suspensão de uma porção de cultura bacteriana pura (retirada de meio de gelose simples após incubação de 18 horas a 37°C) em 750 µl de água bidestilada estéril, seguida de uma centrifugação a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C (*2K15 Sigma*). Posteriormente, o sobrenadante foi rejeitado, adicionaram-se 500 µl de água bidestilada estéril e realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições. Concluída a centrifu-

gação, rejeitou-se novamente o sobrenadante e adicionaram-se 100 µl de água bidestilada estéril. O passo seguinte consistiu na fervura (em banho-maria) dos tubos *ependorf* durante 15 minutos. Findo este tempo realizou-se uma última centrifugação (10000 rpm durante 5 minutos a 4°C) e o sobrenadante (onde se encontrava o DNA) foi transferido para um novo tubo *ependorf* e congelado a -20°C.

3.2. Detecção de genes de resistência através de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Para a pesquisa dos genes de resistência causadores dos fenótipos encontrados nos testes de suscetibilidade já descritos foram realizados 8 tipos de PCR *multiplex* e 13 tipos de PCR simples.

Os PCR *multiplex* responsáveis pela amplificação dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-69}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-50}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{CTX-M-G1/2/9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NMC}, *bla*_{SME}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *ampC*, *bla*_{OXA-1}, *agr1*, *agr2*, *agr3*, *agr4*, *mecA* e *mecC* tiveram todos a seguinte mistura de reação: tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabelas 5 a 8), *Taq polimerase* (1 unidade, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl ou 23 µl (este último volume foi usado para os genes *agr1*, *agr2*, *agr3*, *agr4*, *mecA*, *mecC* e *bla*_{CTX-M-G1/2/9}). Posteriormente, adicionou-se a esta mistura 1 ou 2 µl de DNA, respetivamente.

Tabela 5. Características dos *primers* usados para amplificar genes associados à resistência à metilina (cefotixina) em *Staphylococcus* spp. (Pajić et al., 2014).

Designação do primer	Sequência (5' → 3')	Concentração final (µM)	Gene	Tamanho do fragmento
mecA-F mecA-R	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	0,4	<i>mecA</i>	162 pb
mecC-F mecC-R	GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC	0,4	<i>mecC</i>	138 pb

Tabela 6. Características dos *primers* usados para amplificar genes associados à regulação de fatores de virulência em *S. aureus* (Gilot et al., 2002).

Designação do primer	Sequência (5' → 3')	Concentração final (µM)	Gene	Tamanho do fragmento
Multiplex:				
Pan <i>agr1</i>	ATGCACATGGTGCACATGC GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	0,4	<i>agr1</i>	441 pb
Pan <i>agr2</i>	ATGCACATGGTGCACATGC TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	0,4	<i>agr2</i>	575 pb
Pan <i>agr3</i>	ATGCACATGGTGCACATGC GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	0,4	<i>agr3</i>	323 pb
Pan <i>agr4</i>	ATGCACATGGTGCACATGC CGATAATGCCGTAATACCCG	0,4	<i>agr4</i>	659 pb
PCR simples:				
B1 ^a C2 ^a	TATGCTCCTGCAGCAACTAA CTTGCGCATTCGTTGTTGA	0,4	operão <i>agr</i>	1070 pb

^a*Primers* utilizados também na sequenciação.

Tabela 7. Características dos *primers* usados para amplificar genes que codificam carbapenemases de classe A, B e D.

Designação do <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	Concentração final (μM)	Gene	Tamanho do fragmento	Referência
Multiplex MBL+OXA-50:					
OXA-50F OXA-50R	CCTGATCGGCTTATCCACAG CCCACCAACCAGAAGTTATCC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-50}	249 pb	LNR-RA/ IACS
OXA-48Fint OXA-48R	GACTATATTATTCGGGCTAA ACCACTTCTAGGGAATAATT	0,4	<i>bla</i> _{OXA-48}	140 pb	LNR-RA/ IACS
VIMF VIMR	GTTTGGTCGCATATCGCAAC GGAATGACGAACTGTGCTTC	0,4	<i>bla</i> _{VIM}	557 pb	Fallah et al., 2013
IMP-F IMP-Rold	TCGTTTGAAGAAGTTAACGG GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	0,4	<i>bla</i> _{IMP}	566 pb	LNR-RA/ IACS Hojabri et al., 2013
NDM-F NDM-Rint	GTTTGTATCGTCAGGGATGGC AACGGTGATATTGTCACTGGT	0,4	<i>bla</i> _{NDM}	359 pb	LNR-RA/ IACS
Multiplex OXA:					
OXA-23F OXA-23R	GATCGGATTGGAGAACCAG CTGCTGTCCAATTTTCAG	0,4	<i>bla</i> _{OXA-23}	220 pb	LNR-RA/ IACS
OXA-24F OXA-24R	GATGAAGCTCAAACACAGG ACGAATAGAACCAGACATTCC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-24}	645 pb	LNR-RA/ IACS
OXA-69F OXA-69R	TTTATTTTCAGCCTGCTCAC TGAACAACCCATCCAGTTAACC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-51- tipo}	671 pb	LNR-RA/ IACS
OXA-58F OXA-58R	AAACCCACATACCAACCC CGATCAGAATGTTCAAGC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-58}	591 pb	LNR-RA/ IACS
Multiplex Classe A/D:					
KPC-F KPC-R	ATGTCACTGTATCGCCGTCTAG AGAGCCTTACTGCCCGTTG	0,4	<i>bla</i> _{KPC}	888 pb	LNR-RA/ IACS
GES-Fi GES-Ri	AAAGCAGCTCAGATCGGTGT AATTCGTACGTTCTACGGC	0,4	<i>bla</i> _{GES}	707 pb	Khudhair et al., 2011 LNR-RA/ IACS
NMC-F NMC-R	TTACAATATAGCGACAATGG TTACTTTATCCTCATGCTTG	0,4	<i>bla</i> _{NMC}	457 pb	LNR-RA/ IACS
SME-F SME-R	CAGATGAGCGGTTCCCTTTA AACCCAATCAGCAGGAACAC	0,4	<i>bla</i> _{SME}	509 pb	LNR-RA/ IACS
PCR simples:					
OXA23F_Ex ^a OXA23R_Ex ^a	TTATTTTCTATTGATCTGGTG AAATAATATTTCAGCTGTTTAAATG	0,4	<i>bla</i> _{OXA-23}	847 pb	LNR-RA/ IACS
OXA51F_Ex ^a OXA51R_Ex ^a	CTCAAGTTACATTAATTAGC CTATAAAATACCTAATTGTTC	0,5	<i>bla</i> _{OXA-51}	874 pb	LNR-RA/ IACS Koo et al., 2010
VIM2F ^a VIM2R ^a	CAAAGTTATGCCGCACTCACC GAGCGCAGCGGAGTGATG	0,4	<i>bla</i> _{VIM-G2}	871 pb	LNR-RA/ IACS
GES-F ^a GES-R ^a	TTCCATCTCAAGGGATCACC GCGTCAACTATTTGTCCGTG	0,4	<i>bla</i> _{GES}	891 pb	LNR-RA/ IACS

^a *Primers* utilizados também na sequenciação.

Tabela 8. Características dos *primers* usados para amplificar genes associados a ESBL.

Designação do primer	Sequência (5'→3')	Concentração final (μM)	Gene	Tamanho do fragmento	Referência
Multiplex ESBL:					
P1 P2	TACGATACGGGAGGGCTTAC TTCCTGTTTTTGCTCACCCA	0,2	<i>bla</i> _{TEM}	716 pb	LNR-RA/ IACS
shvf1 shvr2	TCAGCGAAAAACACCTTG TCCCGCAGATAAATCACCA	0,6	<i>bla</i> _{SHV}	471 pb	Liu et al., 1998
oxa1f oxa1r	TATCTACAGCAGCGCCAGTG CGCATCAAATGCCATAAGTG	0,2	<i>bla</i> _{oxA-1}	199 pb	Feria et al., 2002
ampCf ampCr	CCCCGCTTATAGAGCAACAA TCAATGGTCGACTTCACACC	0,2	<i>ampC</i>	634 pb	Féria et al., 2002
Multiplex CTX-M:					
MultiCTXMGp1_for MultiCTXMGp1- 2_rev	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	0,4	<i>bla</i> _{CTX-M-G1}	688 pb	Dallenne et al., 2010
MultiCTXMGp2_for MultiCTXMGp1- 2_rev	CGTTAACGGCAGCATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	0,4	<i>bla</i> _{CTX-M-G2}	404 pb	Dallenne et al., 2010
MultiCTXMGp9_for MultiCTXMGp9_rev	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	0,4	<i>bla</i> _{CTX-M-G9}	561 pb	Dallenne et al., 2010
PCR simples:					
CTX-M-F ^a CTX-M-R ^a	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	0,4	<i>bla</i> _{CTX-M}	544 pb	Edelstein et al., 2003
CTX-Mg8/25_for CTX-Mg8/25_rev	AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGYAT	1	<i>bla</i> _{CTX-M-G8/25}	326 pb	Dallenne et al., 2010
VEB-F ^a VEB-R ^a	CGATTGCTTTAGCCGTTTTG TCCTTTTAATCGGTTACTTCCT	0,4	<i>bla</i> _{VEB}	461 pb	LNR-RA/ IACS
PER-F PER-R	AATCCCCACTGTAAAAAGAGC TGGTCCTGTGGTGGTTTC	0,4	<i>bla</i> _{PER}	590 pb	LNR-RA/ IACS Bae et al., 2011

^a*Primers* utilizados também na sequenciação.

No PCR *multiplex* usado para amplificar os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac* e *qepA*, a mistura de reação consistiu em tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), *Q solution* (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 9), *Taq polimerase* (1,25 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 μl. Posteriormente, adicionou-se a esta mistura 1 μl de DNA.

Tabela 9. Características dos *primers* usados para amplificar genes associados à resistência a quinolonas mediadas por plasmídeos.

Designação do <i>primer</i>	Sequência (5' → 3')	Concentração (μM)	Gene	Tamanho do fragmento	Referência
Multiplex Qnr:					
qnrA qnrB	GGGTATGGATATTATTGATAAAG CTAATCCGGCAGCACTATTA	0,15	<i>qnrA</i>	661 pb	Ellington et al., 2007
qnrBF-TW qnrBR-TW	CCTGAGCGGCACTGAATTTAT GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA	0,15	<i>qnrB</i>	409 pb	Wu et al., 2007
qnrCF2 qnrCR	AACGTACGATCAAATTG TCCACTTTACGAGGTTCT	0,15	<i>qnrC</i>	560 pb	LNR-RA/ IACS Chen et al., 2012
qnrDF qnrDR	CGAGATCAATTTACGGGGAATA AACAAAGCTGAAGCGCCTG	0,15	<i>qnrD</i>	582 pb	Chen et al., 2012
qnrSJF qnrSJR	ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	0,15	<i>qnrS</i>	417 pb	Robicsek et al., 2006
aac6lb-5 aac6lb-6	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTC	0,15	<i>aac</i>	482 pb	Chen et al., 2012
qepAF qepAR	GAACCGATGACGAAGCACAG CGTCGTAAAGCATTCTTGTC	0,15	<i>qepA</i>	1013 pb	Clemente et al., 2013
PCR simples:					
qnrBF-TW ^a QnrBR2 ^a	CCTGAGCGGCACTGAATTTAT CTAACCAATCACCGCGATGC	0,25	<i>qnrB</i>	697 pb	Robicsek et al., 2006 LNR-RA/ IACS

^a *Primers* utilizados também na sequenciação.

Para os PCR simples que visavam a identificação de genes como *qnrB*, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23} foi preparada uma mistura de reação composta pelos seguintes reagentes: tampão (1×, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1×, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabelas 7 e 9), *Taq polimerase* (1,25 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 μl. De seguida, adicionou-se a esta mistura 1 μl de DNA.

Para a amplificação dos genes *bla*_{VIM-G2} e *bla*_{GES} (gene completo) foram realizados dois PCR simples com a seguinte mistura de reação: tampão (1×, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1×, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 7), *Taq polimerase* (0,6 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 μl. Posteriormente, adicionou-se a esta mistura 1 μl de DNA.

O PCR simples para amplificação do operão *agr* implicou a realização da seguinte mistura de reação: tampão (1×, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1×, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 6), *Taq polimerase* (1 unidade, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 23 μl. De seguida foram adicionados 2 μl de DNA. Para se atingir esta concentração ótima de MgCl₂ e a temperatura adequada para este PCR foi necessário a realização de um gradiente de MgCl₂ e de temperatura, respetivamente.

A mistura de reação para os PCR simples que permitiriam a amplificação dos genes *cfr*, *rlmN* e rRNA 23S (domínio V) consistiu em tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 10), *Taq polimerase* (0,75 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl. Posteriormente, foi adicionado 1 µl de DNA.

Tabela 10. Características dos *primers* usados para amplificar genes associados à resistência ao linezolid (*primers* desenhados no LNR-RA/IACS).

Designação do <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	Concentração final (µM)	Gene	Tamanho do fragmento
domV-F ^a domV-R ^a	TCGCCTCCTAAAAGGTAAC GGTCCTCTCGTACTAAGG	0,4	rRNA 23S (domínio V)	411 pb
cfrF ^a cfrR ^a	GTTGGGAGTCATTTTGTATATC ATATAATTGACCACAAGCAGC	0,4	<i>cfr</i>	728 pb
rlmN-F ^a rlmN-R ^a	CAATTAGGAATGATAACTGC AGCATTTGTCTTTACCTCG	0,4	<i>rlmN</i>	1115 pb

^a*Primers* utilizados também na sequenciação.

Para o PCR simples responsável pela amplificação do gene *bla*_{PER}, a mistura de reação consistiu em tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (4 mM, *Qiagen*), Q solution (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 8), *Taq polimerase* (0,5 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl. Posteriormente, adicionou-se a esta mistura 1 µl de DNA.

Para a amplificação dos genes *bla*_{VEB} e *bla*_{CTX-M} foram realizados dois PCR simples com a seguinte mistura de reação: tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 8), *Taq polimerase* (0,5 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl. De seguida, adicionou-se 1 µl de DNA a esta mistura.

Para o PCR simples responsável pela amplificação do gene *bla*_{CTX-M-G8/25} foi realizada a seguinte mistura de reação: tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3,5 mM, *Qiagen*), Q solution (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 8), *Taq polimerase* (0,5 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl. Posteriormente, adicionou-se a esta mistura 1 µl de DNA.

Nos PCR efetuados, todas as misturas de reação foram realizadas numa câmara de fluxo laminar (*Holten Laminair PCR 2002*) e incluíam um controlo negativo e um controlo positivo. Após a adição do DNA, todas as amostras foram amplificadas num termociclador (*C1000™ Thermal Cycler BioRad*) utilizando programas específicos, de acordo com os genes a amplificar, nomeadamente o seu tamanho (Tabela 11).

Tabela 11. Informações sobre os programas utilizados no termociclador para a amplificação dos vários genes descritos anteriormente.

Designação do PCR	Processo	Temperatura (°C)	Tempo
<i>Multiplex mecA e mecC:</i>	Desnaturação	94	5'
	Hibridação	94	30''
		59	
	Extensão	72	1'
PCR simples rRNA 23S (domínio V), <i>cfr</i> , <i>rlmN</i> e <i>multiplex agr typing</i> :	Desnaturação	94	30''
		94	
	Hibridação	53 ^{a,b,c} /59,8 ^d	30''
	Extensão	72	1'
PCR simples operão <i>agr</i> :	Desnaturação	94	30''
		94	
	Hibridação	52,7	1'
	Extensão	72	2'
<i>Multiplex bla_{MBL} + bla_{OXA-50}:</i>	Desnaturação	94	45''
		94	
	Hibridação	59,7	30''
	Extensão	72	1'
<i>Multiplex bla_{OXA} e PCR simples qnrB:</i>	Desnaturação	94	30''
		94	
	Hibridação	58,2 ^e /55,6 ^f	1'
	Extensão	72	30''
<i>Multiplex classe A/D:</i>	Desnaturação	94	45''
		94	
	Hibridação	56	45''
	Extensão	72	1' 15''
PCR simples <i>bla_{OXA-23}</i> , <i>bla_{VIM-G2}</i> e <i>bla_{OXA-51}:</i>	Desnaturação	94	30''
		94	
	Hibridação	52 ^{g,h} /55 ⁱ	1'
	Extensão	72	45''
<i>Multiplex bla_{ESBL}:</i>	Desnaturação	94	1'
		94	
	Hibridação	59	2'
	Extensão	72	1'
<i>Multiplex bla_{CTX-M}:</i>	Desnaturação	94	40''
		94	
	Hibridação	60	40''
	Extensão	72	1'

Tabela 11 (continuação). Informações sobre os programas utilizados no termociclador para a amplificação dos vários genes descritos anteriormente.

PCR	Processo	Temperatura (°C)	Tempo
PCR simples <i>bla</i> _{CTX-M} e <i>Multiplex qnr</i> .	Desnaturação	94	5'/7'
		94	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> 30'' 30''/1'15''^k 1'15''/30''^k </div> <div style="font-size: 3em;">}</div> <div style="margin-left: 10px;"> x 30 ciclos </div> </div>
	Hibridação	55	
	Extensão	72	
		72	5'
PCR simples <i>bla</i> _{CTX-M-G8/25} .	Desnaturação	94	10'
		94	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> 30'' 30'' 30'' </div> <div style="font-size: 3em;">}</div> <div style="margin-left: 10px;"> x 30 ciclos </div> </div>
	Hibridação	55	
	Extensão	72	
		72	10'
PCR simples <i>bla</i> _{PER} e <i>bla</i> _{VEB} .	Desnaturação	94	7'/5' ^m
		94	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> 30'' 30'' 45'' </div> <div style="font-size: 3em;">}</div> <div style="margin-left: 10px;"> x 30 ciclos </div> </div>
	Hibridação	56/58 ^m	
	Extensão	72	
		72	5'
PCR simples <i>bla</i> _{GES} .	Desnaturação	94	7'
		94	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> 30'' 30'' 1' </div> <div style="font-size: 3em;">}</div> <div style="margin-left: 10px;"> x 30 ciclos </div> </div>
	Hibridação	56	
	Extensão	72	
		72	10'

^aPCR simples rRNA 23S (domínio V). ^bPCR simples *cfr*. ^cPCR simples *rlmN*. ^dPCR *multiplex agr typing*. ^ePCR *multiplex bla*_{OXA}. ^fPCR simples *bla*_{qnrB}. ^gPCR simples *bla*_{OXA-23}. ^hPCR simples *bla*_{OXA-51}. ⁱPCR simples *bla*_{VIM-G2}. ^jPCR simples *bla*_{CTX-M}. ^kPCR *multiplex qnr*. ^lPCR simples *bla*_{PER}. ^mPCR simples *bla*_{VEB}.

Terminadas as reações de PCR foram realizadas eletroforeses em gel de agarose de 1,5 a 2% (*Seakem® LE agarose, Lonza*), em TBE 1x (Tris-borato-EDTA) com 4 µl de *SYBR® Safe DNA Gel Stain*, para observação das bandas de DNA amplificadas. Foram aplicados no gel 6 µl de produto de PCR com 2 µl de tampão (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno-cianol e 30% de glicerol) e foram, normalmente, realizadas corridas de 30 minutos a 120 V, para PCR simples, ou de 45 minutos a 120 V, para PCR *multiplex*. Os géis foram observados através da utilização de um transiluminador de luz ultravioleta (*Sistema de Documentação de Imagem BioRad Gel Doc 2000 2001*) e os produtos de PCR foram identificados através da comparação do seu tamanho (em pares de bases - pb) com o de um controlo positivo (de tamanho já conhecido) ou de um marcador de peso molecular (*Roche*).

3.3. Purificação de produtos de PCR

A purificação de produtos de PCR é uma etapa necessária à obtenção de uma melhor sequenciação, uma vez que os reagentes em excesso, ou seja, aqueles que não foram utilizados na reação de amplificação podem comprometer este processo. O sistema de purificação utilizado (*illustra™ ExoProStar™ 1-Step*) consiste numa exonuclease I, responsável pela digestão de DNA em cadeia simples (como os *primers*), e numa fosfatase alcalina, que

promove a desfosforilação dos dNTPs não incorporados (GE Healthcare, 2013). Assim, todos os produtos de PCR obtidos foram submetidos a uma reação de purificação que consistiu na adição de 4 µl de *illustra™ ExoProStar™ 1-Step* a 10 µl de produto de PCR. Esta mistura foi colocada num termociclador (*C1000™ Thermal Cycler BioRad*) onde passou por duas fases: a 1ª fase, a 37°C durante 15 minutos, promoveu a ação daquelas enzimas; e a segunda fase a 80°C durante 15 minutos, inativou essas enzimas. De seguida, procedeu-se novamente a uma eletroforese em gel de agarose, como descrito na secção 3.2., para avaliar o resultado da reação de purificação.

Uma exceção a este processo foi a purificação do produto de PCR para o operão *agr*: devido à presença de bandas inespecíficas foi necessária a utilização de um *kit* (*illustra™, GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare*) para cortar as bandas diretamente do gel de agarose (a 1%) e purificá-las. Todo o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. Sequenciação nucleotídica

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados, com o objetivo de se identificar os genes amplificados. Foram sequenciados os genes rRNA 16S, rRNA 23S (domínio V), *cfr*, *rlmN*, *bla_{VIM-G2}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{VEB}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{GES}*, *qnrB* e o operão *agr*. Para tal preparou-se uma mistura de reação de sequenciação composta pelos seguintes reagentes: 1 µl de *Big Dye Versão 1.1* (*Applied Biosystem*), 0,4 µl do *primer* específico *forward* ou *reverse* (Tabelas 1, 6-10), 0,5/1/2 µl (dependendo da quantidade do produto purificado) de DNA purificado e água bidestilada estéril de modo a obter um volume final de 10 µl. Esta mistura (com a exceção da adição do DNA purificado) foi realizada numa câmara de fluxo laminar (*Holten Laminair PCR 2002*) e foi posteriormente sequenciada num termociclador (*C1000™ Thermal Cycler BioRad*) utilizando o seguinte programa, durante 29 ciclos: 96°C durante 10 segundos para desnaturação das cadeias de DNA, 56°C durante 5 segundos para hibridação dos *primers* e 60°C durante 5 minutos para extensão das cadeias de DNA. Finalizada a reação, o DNA sequenciado foi enviado para a Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, onde foram removidos os terminadores, por precipitação alcoólica, e, posteriormente, foi realizada a migração no sequenciador automático (*ABI PRISM® 3100, Applied Biosystem*), o qual emitiu os registos das sequências nucleotídicas (eletroferogramas). Estes eletroferogramas foram enviados para o LNR-RA/IACS, onde foram analisados com recurso ao *software BioNumerics® Applied Maths* versão 3.5. As sequências nucleotídicas foram comparadas com uma base de dados com a ferramenta BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), o que permitiu a sua identificação.

3.5. Estudo do ambiente genético

Para melhor compreender o mecanismo pelo qual as estirpes em estudo adquiriram resistência a determinado antibiótico e teriam a possibilidade de disseminá-la, tornou-se fundamental o estudo do ambiente genético nas proximidades dos genes de resistência, nomeadamente a pesquisa de MGE. Neste estudo, nas estirpes de *A. baumannii* com origem em hospitais e nas estirpes de *A. pittii* de lares, procurou-se identificar a sequência de inserção *ISAbal*, possivelmente associada aos genes *bla*_{OXA-23} ou *bla*_{OXA-51-tipo}. Esta pesquisa foi realizada com recurso ao PCR, tendo-se preparado a seguinte mistura de reação: tampão (1×, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1×, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 12), *Taq polymerase* (0,5 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl. De seguida adicionou-se 1 µl de DNA e procedeu-se à reação de amplificação num termociclador (*C1000™ Thermal Cycler BioRad*) utilizando um programa específico (Tabela 13). Tal como todas as misturas de reação para os PCR's descritos anteriormente, esta também foi preparada na câmara de fluxo laminar previamente referida. Finalizada a reação de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose (como na secção 3.2.) para analisar a presença de DNA amplificado respeitante à presença da *ISAbal*, tendo o produto de PCR sido purificado de seguida (como na secção 3.3.) e sequenciado (tal como em 3.4.) com *primers* específicos (Tabela 12).

Tabela 12. Combinações dos quatro *primers* usados para a pesquisa da sequência de inserção *ISAbal* associada ao gene *bla*_{OXA-23} ou *bla*_{OXA-51-tipo} (LNR-RA/IACS; Turton et al., 2006).

Designação do <i>primer</i>	Sequência (5'→ 3')	Concentração final (µM)	Gene + MGE	Tamanho do fragmento
OXA-23F ISAbalF	GATCGGATTGGAGAACCAG CACGAATGCAGAAGTTG	0,4	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>ISAbal</i>	Variável
OXA-23F ISAbalR	GATCGGATTGGAGAACCAG CGACGAATACTATGACAC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>ISAbal</i>	Variável
OXA-23R ^a ISAbalF ^a	CTGCTGTCCAATTTTCAG CACGAATGCAGAAGTTG	0,4	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>ISAbal</i>	Variável
OXA-23R ISAbalR	CTGCTGTCCAATTTTCAG CGACGAATACTATGACAC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>ISAbal</i>	Variável
OXA-69F ISAbalF	TTTATTTTCAGCCTGCTCAC CACGAATGCAGAAGTTG	0,4	<i>bla</i> _{OXA-51-tipo} + <i>ISAbal</i>	Variável
OXA-69F ISAbalR	TTTATTTTCAGCCTGCTCAC CGACGAATACTATGACAC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-51-tipo} + <i>ISAbal</i>	Variável
OXA-69R ISAbalR	TGAACAACCCATCCAGTTAACC CGACGAATACTATGACAC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-51-tipo} + <i>ISAbal</i>	Variável

^a*Primers* utilizados também na sequenciação.

Tabela 13. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação de IS*Aba1* associada aos genes *bla*_{OXA-51-tipo} OU *bla*_{OXA-23}.

Processo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	5'
Hibridação	94	30''
	52	30''
	72	2'
Extensão	72	10'

} x 30 ciclos

4. Teste Bioquímico para detecção de carbapenemases

Para quatro estirpes de *A. baumannii* que tinham um fenótipo que indicava a presença de MBL mas que a pesquisa por PCR se revelou negativa, utilizou-se o teste Blue-Carba para detetar uma possível carbapenemase. Este teste apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade e deteta a hidrólise do anel β -lactâmico dos carbapenemes através da acidificação de uma solução de azul de bromotimol (indicador colorimétrico) em *Acinetobacter* spp., *Enterobacteriaceae* spp. e *Pseudomonas* spp., diretamente de culturas bacterianas. Uma solução para 10 isolados contém 990 μ l de azul de bromotimol a 0,04% (pH 6), 16,6 ml de água destilada, 10 μ l de sulfato de zinco a 10 mM e 6 mg de Tienam[®] 500 (o que equivale a 3 mg de imipeneme monoidratado). A solução controlo consiste apenas em azul de bromotimol a 0,04% (pH 7) e permite controlar a influência de produtos ou componentes bacterianos no pH da solução. Este teste foi realizado numa microplaca de 96 poços, onde foram colocados 100 μ l da solução teste e da solução controlo, adicionando-se posteriormente à solução teste cerca de 5 μ l de cultura bacteriana pura (em meio de gelose simples). A microplaca foi incubada a 37°C até um máximo de duas horas, uma vez que algumas carbapenemases, como MBL ou KPC, alteram a cor da solução após 30 minutos de incubação, enquanto outras, como OXA, necessitam de 1 hora e 30 minutos a 2 horas para se observar a alteração de cor. Consideramos que estamos na presença de um resultado positivo quando a solução teste é amarela e a controlo é azul/verde ou quando a solução teste é verde e a controlo é azul (Pires et al., 2013).

5. Determinação da clonalidade e diversidade genética

5.1. Linhagens clonais de *A. baumannii*

O estudo de vários surtos em hospitais, por todo o mundo, causados por *A. baumannii* multirresistentes permitiu concluir que estes se deviam a grupos restritos de estirpes, que foram, posteriormente, agrupadas em três linhagens clonais, atualmente denominadas clones internacionais I, II e III (Durante-mangoni e Zarrilli, 2011).

Para identificar se as estirpes de *A. baumannii* em estudo pertenciam a algum destes três clones internacionais realizou-se uma pesquisa de três genes utilizando dois PCR *multiplex*: o *csuE*, importante na construção do *pilus*, o *ompA*, que codifica para uma porina (proteína A) da membrana externa que tem a capacidade de induzir apoptose das células epiteliais, e o *bla*_{OXA-51-tipo} que, como já foi referido em 1.2.4.2. (B), codifica uma carbapenemase intrínseca (Turton et al., 2007). Para os dois PCR foram efetuadas misturas de reação que apenas divergiram nos *primers*: tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 14), *Taq polimerase* (1,25 unidades, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 23 µl. O DNA foi adicionado, posteriormente, numa quantidade de 2 µl. Os programas para amplificação do DNA através PCR *multiplex* também eram idênticos (Tabela 15). Uma eletroforese em gel de agarose (descrita na secção 3.2.) permitiu analisar os produtos da amplificação e interpretar os resultados de acordo com a Tabela 16.

Tabela 14. Características dos *primers* utilizados nos PCR *multiplex* 1 e 2 que permitiam identificar os clones internacionais I, II e III (Turton et al., 2007).

Designação do primer	Sequência (5'→3')	Concentração final (µM)	Gene	Tamanho do fragmento
Multiplex 1:				
G1ompAF G1/G2ompAR	GATGGCGTAAATCGTGGT CAACTTTAGCGATTTCTGG	0,4	<i>ompA</i>	355 pb
G1csuEF G1csuER	CTTTAGCAAACATGACCTACC TACACCCGGGTTAATCGT	0,4	<i>csuE</i>	702 pb
G1OXA66F G1OXA66R	GCGCTTCAAATCTGATGTA GCGTATATTTGTTTCCATTC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-51-tipo}	559 pb
Multiplex 2:				
G2ompAF G1/G2ompAR	GACCTTTCTTATCACAACGA CAACTTTAGCGATTTCTGG	0,4	<i>ompA</i>	343 pb
G2csuEF G2csuER	GGCGAACATGACCTATTT CTTCATGGCTCGTTGGTT	0,4	<i>csuE</i>	580 pb
G2OXA69F G2OXA69R	CATCAAGGTCAAACCTCAA TAGCCTTTTTTCCCCATC	0,4	<i>bla</i> _{OXA-51-tipo}	162 pb

Tabela 15. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos genes *ompA*, *csuE* e *bla*_{OXA-51-tipo}.

Processo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	7'
	94	45'' 45'' 1' } × 30 ciclos
Hibridação	57	
Extensão	72	
	72	5'

Tabela 16. Critérios utilizados para interpretação dos PCR *multiplex* 1 e 2 das linhagens clonais de *A. baumannii* (Turton et al., 2007; Towner et al., 2008).

Designação do grupo	PCR <i>multiplex</i> 1			PCR <i>multiplex</i> 2		
	<i>csuE</i> 702 pb	<i>bla</i> _{OXA-51-tipo} 559 pb	<i>ompA</i> 355 pb	<i>csuE</i> 580 pb	<i>ompA</i> 343 pb	<i>bla</i> _{OXA-51-tipo} 162 pb
Grupo 1 (clone internacional II)	+	+	+	-	-	-
Grupo 2 (clone internacional I)	-	-	-	+	+	+
Grupo 3 (clone internacional III)	+	+	-	-	+	-
Grupo 4	-	+	+	-	-	-
Grupo 5	-	-	+	-	-	-
Grupo 6	+	-	-	-	+	+
Grupo 7	-	-	+	+	-	-

5.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

O método de MLST consiste na caracterização da diversidade genética de estirpes bacterianas, baseada na amplificação e sequenciação de sete *housekeeping genes*, ou seja, genes essenciais para o desempenho de funções metabólicas básicas na célula. A cada gene, quando característico de determinada espécie ou estirpe, é atribuído um número de alelo e o conjunto dos números dos sete alelos constitui um perfil alélico ou *sequence type* (ST). Estes ST, quando comparados, permitem a avaliação da variabilidade genética dentro e entre populações, podendo também fornecer informações sobre o fluxo genético (Pérez-Losada et al., 2013).

Neste estudo foram determinados os ST para as estirpes de *S. aureus*, tanto dos isolados humanos, como das estirpes de veterinária, e de *A. baumannii*. O primeiro passo consistiu na amplificação por PCR, dos sete *housekeeping genes*, através de uma mistura de reação com a seguinte composição para *S. aureus*: tampão (1x, Qiagen), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, Roche Diagnostics), MgCl₂ (3 mM, Qiagen), Q solution (1x, Qiagen), *primers* específicos (Tabela 17), *Taq polimerase* (0,6 unidades, Qiagen) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 23 µl, para os genes *gmk* e *tpi*, ou de 24 µl para os restantes. Posteriormente, adicionaram-se a esta mistura 2 ou 1 µl de DNA, respetivamente. Para *A. baumannii* a mistura de reação (com exceção do gene *gdhB*) consistiu em tampão (1x, Qiagen), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, Roche Diagnostics), Q solution (1x, Qiagen), *primers* específicos (Tabela 18), *Taq polimerase* (1 unidade, Qiagen) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µl (para os genes *gltA*, *gyrB*, *recA* e *rpoD*) ou de 23 µl (para os genes *cpn60* e *gpi*). Foram adicionados a esta mistura 1 ou 2 µl de DNA, consoante os genes em causa. Para o gene *gdhB* foi necessária a realização de um gradiente de temperatura e de um gradiente de MgCl₂ para se obterem as

condições de amplificação adequadas. Assim, a mistura de reação mais indicada para este gene foi: tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3 mM, *Qiagen*), Q solution (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 18), *Taq polimerase* (1 unidade, *Qiagen*) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 23 µl. De seguida foram adicionados 2 µl de DNA. Estas misturas de reação foram amplificadas num termociclador com programas/condições distintos (as) (Tabelas 19 e 20). Os resultados obtidos foram observados pela leitura em gel de agarose, após eletroforese (como descrito na secção 3.2.). Os produtos de amplificação com DNA de tamanho esperado foram purificados (ver secção 3.3.) e sequenciados (ver secção 3.4.) com os *primers* específicos indicados nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17. Características dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciação dos sete *housekeeping genes* (MLST) de *S. aureus* (LNR-RA/IACS).

Designação do primer	Sequência (5'→3')	Concentração final (µM)	Gene	Tamanho do fragmento
arc-F arc-R ^a	GCGTATTGTCATTTACAT GGTATCTGCTTCAATCAG	0,4	<i>arc</i>	556 pb
aro-F ^a aro-R	CAGTTATCGGAAATCCTATTTTC GGTGTGTATTAATAACGATAT	0,4	<i>aro</i>	541 pb
glp-F ^a glp-R	CTAGGAAGTCAATCTTAATC GGTAAAATCGCATGTCCAATTC	0,4	<i>glp</i>	575 pb
gmk-F ^a gmk-R	GGATTGTTAATCGTTTTATCAG TCATTAACACGTAATCG	0,4	<i>gmk</i>	497 pb
pta-F pta-R ^a	GTAAAATCGTATTACCTGAAG GATTTAGCAGACCCTTTTGTG	0,4	<i>pta</i>	584 pb
tpi-F ^a tpi-R ^a	GTAAATACGTTGTTATCGG GTACGAAATCTTCAACTTTAAG	0,4	<i>tpi</i>	472 pb
yqi-F yqi-R ^a	AGCATACAGGACACCTATTGG CGTTGAGGAATCGATACTGGA	0,4	<i>yqi</i>	497 pb

^a*Primers* utilizados também na sequenciação.

Tabela 18. Características dos *primers* usados para amplificação e sequenciação dos sete *housekeeping genes* em *A. baumannii* (segundo o esquema de Oxford).

Designação do primer	Sequência (5'→3')	Concentração final (µM)	Gene	Tamanho do fragmento	Referência
Citrato F1 ^a Citrato R12	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	0,4	<i>gltA</i>	722 pb	Bartual et al., 2005
gyrB_F ^a gyrB_R	TGAAGGCGGCTTATCTGAGT GCTGGGTCTTTTCTGACA	0,4	<i>gyrB</i>	594 pb	^b
GDH SEC F ^a GDHB 775R	ACCACATGCTTTGTTATG GTTGAGTTGGCGTATGTTGTGC	0,5 0,4	<i>gdhB</i>	≈ 500 pb	Bartual et al., 2005
RA1 ^a RA2	CCTGAATCTTCYGGTAAAC GTTTCTGGGCTGCCAACATTAC	0,4	<i>recA</i>	425 pb	Bartual et al., 2005
CPN 3F2 ^a CPN R2	ACTGTACTTGCTCAAGC TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	0,4	<i>cpn60</i>	640 pb	Bartual et al., 2005
GPI F1 ^a GPI R1	AATACCGTGGTGCTACGGG AACTTGATTTTCAGGAGC	0,4	<i>gpi</i>	456 pb	Bartual et al., 2005
rpoD-F ^a rpoD-R	ACCCGTGAAGGTGAAATCAG TTCAGCTGGAGCTTTAGCAAT	20	<i>rpoD</i>	672 pb	^b

^a*Primers* utilizados também na sequenciação. ^b http://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Oxford.shtml

A identificação do número de cada alelo foi realizada com o auxílio das bases de dados que se encontram em <http://saureus.beta.mlst.net/> (para *S. aureus*) e em <http://pubmlst.org/abaumannii/> (para *A. baumannii*). Para os ST de *S. aureus* utilizou-se ainda o algoritmo eBURST (disponível em <http://eburst.mlst.net/>), cujos valores de *bootstrap* correspondem ao nível de confiança, e o software *BioNumerics*® *Applied Maths* versão 3.5 para a construção de uma *minimum spanning tree*, permitindo estabelecer uma relação entre os vários ST.

Tabela 19. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos sete *housekeeping genes* (MLST) de *S. aureus*.

Processo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	5'
	94	30"
Hibridação	53/57 ^a	30"
Extensão	72	45"
	72	10'

^aTemperatura utilizada apenas para o gene *yqi*.

Tabela 20. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos sete *housekeeping genes* (MLST) de *A. baumannii*.

Processo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	5'
	94	1'
Hibridação	55/50 ^a	1'
Extensão	72	2'
	72	10'

^aTemperatura utilizada apenas para o gene *cpn60* e *gpi*.

5.3. *Staphylococcus aureus* protein A (*spa*) typing

A proteína A de *S. aureus* é codificada pelo gene *spa*, encontra-se ancorada na parede celular e tem a capacidade de se ligar às IgG (Imunoglobulinas G), comprometendo o sistema imunitário do hospedeiro. Este gene é específico desta espécie, contendo uma região (X_R) com grande variabilidade que resulta da acumulação de pequenas repetições (*short tandem repeats* que variam não só em número mas também em substituições nucleotídicas), às quais são atribuídos algarismos específicos. Ao conjunto dos algarismos que denominam as diversas repetições atribui-se uma classificação que consiste num \dagger seguido de um número (por exemplo, t045). Esta técnica é usada para avaliação da variabilidade genética, tendo maior poder discriminativo do que a técnica de MLST (Baum et al., 2009; Grundmann et al., 2010; Falugi et al., 2013; Foster e Geoghegan, 2015).

A região X_R do gene *spa* foi amplificada por PCR para todos os *S. aureus* estudados, usando a seguinte mistura de reação: tampão (1x, *Qiagen*), dNTPs (0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), $MgCl_2$ (3 mM, *Qiagen*), *Q solution* (1x, *Qiagen*), *primers* específicos (Tabela 21), *Taq polimerase* (1 unidade, *Qiagen*) e água bidestilada esteril até perfazer um volume de 23 μ l. Posteriormente foram adicionados 2 μ l de DNA. Num termociclador, o DNA desta mistura foi amplificado, usando o programa descrito na Tabela 22; os resultados foram visualizados após migração dos produtos de PCR num gel de agarose (como na secção 3.2.). Quando positivos, os produtos de PCR foram purificados (como em 3.3.) e sequenciados (como em 3.4. e com os *primers* da Tabela 21), para posterior identificação usando o programa disponível em <http://spatyper.fortinbras.us/>.

Tabela 21. Características dos *primers* utilizados para a amplificação e sequenciação da região X_R do gene *spa* (Larsen et al., 2008).

Designação do <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	Concentração final (μ M)	Gene	Tamanho do fragmento
spa-F ^a spa-R	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	0,4	<i>spa</i>	Variável (180-600 pb)

^a*Primers* utilizados também na sequenciação.

Tabela 22. Informação sobre o programa utilizado no termociclador para a amplificação da região X_R do gene *spa*.

Processo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	5'
	94	30"
Hibridação	59	1' } x 30 ciclos
Extensão	72	1' }
	72	10'

5.4. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A técnica de PFGE permite comparar o genoma de vários isolados, através do uso de enzimas de restrição, e avaliar a sua relação genética (clonalidade), possuindo maior poder discriminativo do que o MLST (secção 5.2.) e *spa typing* (secção 5.3.) para detetar eventos genéticos ocorridos mais recentemente (Foster e Geoghegan, 2015). Este método foi utilizado em estirpes de *K. oxytoca* com origem em lares (n=1) e em hospitais (n=10). As estirpes de origem hospitalar já tinham sido analisadas anteriormente pelo LNR-RA/IACS e foram utilizadas neste estudo para comparação com a estirpe do lar.

5.4.1. Preparação dos discos

Todas as estirpes utilizadas nesta técnica foram semeadas em meio de gelose de simples e incubadas a 37°C durante 18 horas. Posteriormente, emulsionou-se uma ansa de

10 µl de cada uma destas culturas em 1 ml de tampão fosfato a 50 mM (0,05 M a pH 8), e centrifugaram-se as amostras, durante 10 minutos a 6600 rpm a 4°C. Foram rejeitados, aproximadamente, 150 µl do sobrenadante, tendo sido o restante volume emulsionado e a sua absorvância lida a 650 nm (os valores oscilavam entre 1,6 e 1,65). Desta solução, retiraram-se 300 µl que foram submetidos a uma temperatura de 41°C, em banho-maria, durante 5 minutos e aos quais foram, posteriormente, adicionados 300 µl de gel de agarose a 1,5% (0,15g de *Agarose Seaplaque GTG* com 10 ml de tampão fosfato).

Com o auxílio de seringas de 1 ml, estas soluções foram aspiradas e permaneceram no congelador durante 4 minutos, sendo depois colocadas à temperatura ambiente, durante 10 minutos. O passo seguinte consistiu no corte de discos, com cerca de 1 mm de espessura, que foram colocados em tubos *falcon* de 15 ml com 1 ml de tampão de lise celular e incubados a 50°C, em banho-maria, durante 3 horas. Concluído o tempo de incubação, foi retirado o tampão de lise celular e adicionado 1 ml de uma solução de digestão com 13 g de proteinase K e as soluções foram incubadas *overnight*, a 55°C (banho-maria), com agitação. No dia seguinte, a solução de digestão com proteinase K foi rejeitada, adicionaram-se 5 ml de água destilada estéril e as amostras foram colocadas num agitador orbital a 20 rev/s, durante 5 minutos à temperatura ambiente, para a respetiva lavagem. Findo este tempo, a água foi rejeitada e adicionaram-se 10 ml de tampão TE 1x, seguidos de agitação à temperatura ambiente durante 30 minutos. Este último passo foi repetido quatro vezes e, seguidamente, os discos foram colocados em tubos com 0,5 ml de tampão TE 1x e armazenados a 4°C.

5.4.2. Digestão enzimática

Para este procedimento, o tampão TE 1x foi retirado dos tubos e foram adicionados 100 µl de um tampão de equilíbrio [10 µl de tampão específico da enzima, NEB2 (*New England BioLabs*[®]_{Inc.}), e 90 µl de água destilada estéril] para posterior incubação a 37°C, em banho-maria, durante 10 minutos. Concluído o tempo, este tampão foi rejeitado e foram adicionados 100 µl de uma solução de restrição constituída por 87 µl de água destilada estéril, 10 µl de tampão NEB2, 1 µl de solução BSA (*Bovine serum albumin*, *New England BioLabs*[®]_{Inc.}) e 2 µl de *XbaI* (*New England BioLabs*[®]_{Inc.}), seguidos de uma incubação a 37°C (banho-maria) durante 16 horas. A restrição foi cessada através da exposição dos tubos a uma temperatura de 4°C.

5.4.3. Gel de PFGE

Foi preparado um gel de agarose a 1,2% (*Agarose Seakem Gold* e solução TBE 0,5x), para um volume de 200 ml, que foi vertido para o suporte já montado e deixado a polimerizar. De seguida, foi colocado um disco em cada poço, juntamente com os marcadores

(*Lambda DNA*, *New England BioLabs*[®]_{Inc.}); todos os poços foram lacrados com a agarose restante e foi iniciado um programa com os seguintes parâmetros: 6 V/cm; ângulo de 120°; pulso inicial: 0,1 segundos; pulso final: 36 segundos; migração: 24 horas; temperatura: 11°C. Finalizada a migração, o gel foi colocado em 1 L de tampão TBE a 0,5x com 50 µl de *Gel Red* durante aproximadamente 20 minutos; posteriormente procedeu-se à descoloração, a qual consistiu na introdução do gel em água desmineralizada durante 18 horas. Concluído este tempo, os resultados foram observados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta (*Sistema de Documentação de Imagem BioRad Gel Doc 2000 2001*).

III. Resultados

1. Análise fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos

Os métodos de difusão em disco e de E-teste permitiram a obtenção de resultados importantes sobre a suscetibilidade aos antibióticos de estirpes de *Staphylococcus* spp., *E. acetylicum*, *M. luteus*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Pantoea* spp. e *K. oxytoca* coletadas de humanos em ambiente nosocomial, de ambiente (ar) de lares e de animais. Estes resultados estão discriminados de seguida.

1.1. *Staphylococcus* spp.

No que diz respeito às 58 estirpes de *S. aureus*, a maioria eram MRSA (70,7%), ou seja, demonstraram suscetibilidade diminuída à cefoxitina, o que nos permitiu extrapolar que também fossem resistentes à meticilina e oxacilina. Também uma elevada proporção destas estirpes (82,8%) apresentou suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina. Para além destas, foram ainda detetadas outras suscetibilidades diminuídas à daptomicina (17,2%), à teicoplanina (3,4%), ao linezolid (3,4%) e à vancomicina (1,7%) (Tabela 23). Onze (19%) *S. aureus* apresentavam um fenótipo de multirresistência e um (1,7%) foi caracterizado como sendo hGISA.

Ao contrário dos anteriores, os fenótipos dos 17 *S. aureus* isolados em animais revelaram perfis de suscetibilidade a praticamente todos os antibióticos testados, com exceção de quatro estirpes, isoladas de coelhos, que apresentaram suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina (Tabela 23).

Ambas as estirpes de *S. capitis* (uma isolada de um humano em ambiente hospitalar e a outra do ambiente de um lar) apresentaram o mesmo fenótipo, que se caracterizava pela resistência à cefoxitina e ciprofloxacina (Tabela 23). O lar em causa (lar A) encontrava-se na área abrangida pelo hospital 34 do estudo. Neste hospital foram isoladas a estirpe de *S. capitis*, de uma infeção adquirida na comunidade, e duas estirpes de *S. aureus* resistentes à ciprofloxacina, uma com origem na comunidade e a outra era nosocomial; só a de origem nosocomial tinha também uma suscetibilidade diminuída à cefoxitina.

Por outro lado, a estirpe de *S. epidermidis* isolada no hospital 33 apresentou um fenótipo bastante distinto das duas estirpes de *S. epidermidis* provenientes de um lar, revelando suscetibilidade diminuída não só à cefoxitina e à ciprofloxacina mas também ao linezolid e à teicoplanina, sendo, portanto, multirresistente. O E-teste GRD revelou tratar-se de uma estirpe hGISE. As estirpes do lar revelaram-se suscetíveis a todos os antibióticos testados (Tabela 23).

Tabela 23. Suscetibilidade aos antibióticos das 87 estirpes de *Staphylococcus* de origem humana (n=60), animal (n=17) e de ambiente de lares (n=9).

Antibiótico	<i>S. aureus</i> Nº (%)				<i>S. capitis</i> Nº				<i>S. epidermidis</i> Nº				<i>S. haemolyticus</i> Nº		<i>Staphylococcus</i> spp. ^a Nº	
	Humanos (n=58)		Veterinária (n=17)		Humano (n=1)		Lar (n=1)		Humano (n=1)		Lar (n=2)		Lar (n=3)		Lar e veterinária (n=4)	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
FOX	41 (70,7)	17 (29,3)	0 (0)	17 (100)	1	0	1	0	1	0	0	2	0	3	0	4
CIP	48 (82,8)	10 (17,2)	4 (23,5)	13 (76,5)	1	0	1	0	1	0	0	2	2	1	0	4
LNZ	2 (3,4)	56 (96,6)	0 (0)	17 (100)	0	1	0	1	1	0	0	2	0	3	0	4
DPC	10 (17,2)	48 (82,8)	0 (0)	17 (100)	0	1	0	1	0	1	0	2	0	3	0	4
TP	2 (3,4)	56 (96,6)	0 (0)	17 (100)	0	1	0	1	1	0	0	2	0	3	0	4
VA	1 (1,7)	57 (98,3)	0 (0)	17 (100)	0	1	0	1	0	1	0	2	0	3	0	4

^a*S. hominis* (n=1), *S. xylosus* (n=1) isolados do ambiente do lar A e *S. simiae* (n=1) isolado de um animal.

Este lar era o mesmo em que foi coletada a estirpe de *S. capitis* (lar A), referida anteriormente; no entanto, o hospital 33, em que foram coletadas as estirpes de *S. epidermidis*, não era o hospital mais próximo do referido lar (6,7 km), sendo o hospital 34 o que se encontrava mais perto (a 5,3 km do lar).

Das três restantes estirpes de *Staphylococcus* spp. encontradas no ambiente de lares, apenas duas de *S. haemolyticus* revelaram uma suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina; todas as outras foram suscetíveis aos antibióticos testados (Tabela 23). Todas estas estirpes foram coletadas no mesmo lar (lar A) que *S. capitis* e *S. epidermidis*.

Na área da veterinária, a única estirpe de *S. simiae* mostrou ser também suscetível a todos os antibióticos testados (Tabela 23).

1.2. Outras bactérias de Gram positivo

A única estirpe de *Exiguobacterium acetylicum*, isolada de humanos em ambiente hospitalar, apresentou uma suscetibilidade diminuída à daptomicina, sendo que se revelou suscetível a todos os outros antibióticos testados. Esta bactéria foi isolada no hospital 34.

Por outro lado, as três estirpes de *Micrococcus luteus* com origem em lares possuíam suscetibilidade a todos os antibióticos testados. Estas bactérias foram coletadas no mesmo lar das estirpes de *S. capitis* e *S. epidermidis*.

1.3. *Acinetobacter* spp.

As 15 estirpes de *A. baumannii* estudadas (100%) apresentaram suscetibilidade diminuída aos três carbapenemes ensaiados (doripeneme, imipeneme e meropeneme) e à ciprofloxacina. Destas, 93,3% também tinham suscetibilidade diminuída à tobramicina, gentamicina e amicacina, correspondendo, portanto, a estirpes multirresistentes (Tabela 24). Em 11 estirpes foram ainda detetadas sinergias entre ceftazidima e amoxicilina + ácido clavulânico + cloxacilina, bem como entre imipeneme + DPA e carbapenemes. Quatro estirpes revelaram uma diferença maior ou igual a 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição do imipeneme e do imipeneme + DPA, o que poderia ser um indicador de produção de MBL.

As estirpes de *Acinetobacter* spp. coletadas no ambiente de dois lares (A e D) diferentes (*A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. lwoffii* e *A. pittii*) revelaram ser suscetíveis a todos os antibióticos ensaiados (Tabela 24). Esses lares encontravam-se nas proximidades dos hospitais 27 e 34 (D e A, respetivamente), onde não foram identificadas estirpes de *A. baumannii*. A estirpe de *A. haemolyticus* foi ainda comparada com uma estirpe da mesma espécie mas isolada no Hospital 8 (estudada anteriormente pelo LNR-RA/IACS e usada neste estudo apenas para comparação), sendo os fenótipos exatamente iguais. Este lar e o hospital 8 não estavam relacionados geograficamente.

Tabela 24. Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes *Acinetobacter* spp. coletadas em hospitais e ambiente de lares.

Antibiótico	<i>A. baumannii</i> de humanos (n=15) Nº (%)		<i>A. haemolyticus</i> de humanos (n=1) Nº		<i>Acinetobacter</i> spp. ^a de lares (n=5) Nº	
	R	S	R	S	R	S
DOR	15 (100)	0 (0)	0	1	0	5
IMP	15 (100)	0 (0)	0	1	0	5
MEM	15 (100)	0 (0)	0	1	0	5
CIP	15 (100)	0 (0)	0	1	0	5
TMN	14 (93,3)	1 (6,7)	0	1	0	5
GEN	14 (93,3)	1 (6,7)	0	1	0	5
AN	14 (93,3)	1 (6,7)	0	1	0	5

^a *A. haemolyticus* (n=1), *A. junii* (n=1), *A. Iwoffii* (n=1) e *A. pittii* (n=2).

1.4. *Pseudomonas* spp.

As 15 estirpes de *P. aeruginosa* estudadas apresentaram suscetibilidade diminuída a 10 antibióticos distribuindo-se da seguinte forma: 93,3% tinham resistência à piperacilina + tazobactame e ciprofloxacina, 80% ao imipeneme e ceftazidima, 73,3% ao doripeneme e meropeneme, 66,7% à tobramicina e gentamicina, 60% ao cefepime e 46,7% à amicacina. Foi ainda observada suscetibilidade intermédia ao meropeneme (20%), doripeneme (13,3%), imipeneme (13,3%), ciprofloxacina (6,7%) e amicacina (6,7%) (Tabela 25). Dez estirpes de *P. aeruginosa* (66,7%) apresentaram um fenótipo de multirresistência, com suscetibilidade diminuída aos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. Das 15 *P. aeruginosa*, 14 apresentaram as seguintes sinergias: imipeneme + DPA com carbapenemes, ceftazidima (30 μ g) com amoxicilina + ácido clavulânico + cloxacilina, imipeneme com amoxicilina + ácido clavulânico + cloxacilina e ácido borónico com carbapenemes (possível presença de uma carbapenemase de classe A). Duas estirpes apresentaram ainda antagonismo entre ceftazidima (10 μ g) e imipeneme. É de realçar a existência de uma diferença de 5 mm ou mais entre os diâmetros dos halos de inibição do imipeneme e do imipeneme + DPA em dois isolados, o que poderá ser um indicador de produção de MBL, mas também entre os halos da ceftazidima (30 μ g) e ceftazidima + ácido clavulânico em outros dois isolados, sendo um indício de produção de ESBL.

Das *Pseudomonas* spp. com origem em lares, a estirpe de *P. fluorescens* do lar D foi comparada com uma estirpe da mesma espécie mas do hospital 10 (não relacionado geograficamente com este lar), sendo o fenótipo de suscetibilidade destas duas estirpes bacterianas bastante distinto, isto é, a estirpe do lar era suscetível a todos os antibióticos ensaiados e a estirpe proveniente do hospital possuía resistência ao cefepime, imipeneme, meropeneme, gentamicina e suscetibilidade intermédia à amicacina (esta última estirpe foi estudada anteriormente pelo LNR-RA/IACS e usada neste estudo apenas para comparação).

Das restantes *Pseudomonas* spp. coletadas em lares, apenas duas *P. putida* apresentaram suscetibilidade intermédia ao meropeneme, sendo uma delas também resistente à piperacilina + tazobactame (Tabela 25). O lar de origem (D) destas bactérias encontrava-se na proximidade do hospital 27, onde foi isolada uma *P. aeruginosa* com origem numa infeção nosocomial e com suscetibilidade diminuída à classe das quinolonas, aminoglicosídeos e β -lactâmicos.

Tabela 25. Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes de *Pseudomonas* spp. coletadas em hospitais e ambiente de lares.

Antibiótico	<i>P. aeruginosa</i>			<i>P. fluorescens</i>					<i>P. putida</i>			<i>P. oryzihabitans</i>	
	Humanos (n=15) Nº (%)			Humanos (n=1) Nº			Lares (n=1) Nº		Lares (n=3) Nº			Lares (n=3) Nº	
	R	I	S	R	I	S	R	S	R	I	S	R	S
TPZ	14 (93,3)	0 (0)	1 (6,7)	0	0	1	0	1	1	0	2	0	4
CAZ (10)	12 (80)	0 (0)	3 (20)	0	0	1	0	1	0	0	3	0	4
FEP	9 (60)	0 (0)	6 (40)	1	0	0	0	1	0	0	3	0	4
DOR	11 (73,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	0	0	1	0	1	0	0	3	0	4
IMP	12 (80)	2 (13,3)	1 (6,7)	1	0	0	0	1	0	0	3	0	4
MEM	11 (73,3)	3 (20)	1 (6,7)	1	0	0	0	1	0	2	1	0	4
CIP	14 (93,3)	1 (6,7)	0 (0)	0	0	1	0	1	0	0	3	0	4
TMN	10 (66,7)	0 (0)	5 (33,3)	0	0	1	0	1	0	0	3	0	4
GEN	10 (66,7)	0 (0)	5 (33,3)	1	0	0	0	1	0	0	3	0	4
AN	7 (46,7)	1 (6,7)	7 (46,7)	0	1	0	0	1	0	0	3	0	4

1.5. Outras bactérias de Gram negativo

As estirpes de *Pantoea* spp. e *Sphingomonas paucimobilis* coletadas no ar do lar D revelaram-se suscetíveis a todos os antibióticos testados. Por outro lado, a estirpe de *Klebsiella oxytoca* do lar C, que se localiza nas proximidades do hospital 34, apresentou um fenótipo de resistência à ampicilina, ciprofloxacina, ofloxacina e levofloxacina, um fenótipo de suscetibilidade intermédia à piperacilina e piperacilina + tazobactame e ainda sinergia entre ceftazidima + ácido clavulânico e ampicilina.

2. Identificação dos genes responsáveis pelo fenótipo de suscetibilidade diminuída

2.1. *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a pesquisa de genes *mecA* e *mecC* em todas as estirpes de *S. aureus*. Das 41 estirpes coletadas em hospitais, com fenótipo de suscetibilidade diminuída à cefoxitina, 40 (69%) eram positivas para o gene *mecA*, confirmando, assim, esse fenótipo (Tabela 23). A exceção foi uma estirpe resistente à cefoxitina, a qual apresentou um resultado

negativo para ambos os genes *mecA* e *mecC*. Não foi encontrado o gene *mecC* em qualquer das estirpes de *S. aureus*.

Em *S. aureus* de origem humana foram detetados os genes rRNA 23S (domínio V) e *rlmN* em dois isolados com suscetibilidade diminuída ao linezolid. Após sequenciação foram identificadas no gene rRNA 23S (domínio V), em relação ao genótipo *wild type* (WT): uma possível substituição G→T na posição 2603 (nesta posição existem dois picos sobrepostos, G e T) e G→A na posição 2695 para uma estirpe (Sa810); noutra estirpe (Sa817) identificou-se apenas a substituição G→A na posição 2695. Para a estirpe Sa810 foram também encontradas substituições no gene *rlmN* (T→G na posição 111, T→C na posição 384, C→T na posição 666, A→G na posição 948 e A→G na posição 1035), assim como para a estirpe Sa817 (C→T na posição 666, T→C na posição 675, A→G na posição 948 e A→G na posição 1035) (Tabela 26). O PCR para pesquisa do gene *cfr* amplificou uma banda para os dois isolados de *S. aureus* resistentes ao linezolid mas, a posterior sequenciação revelou tratarem-se de uma *chaperone DNAJ* para uma das estirpes e de bandas inespecíficas para outra.

As 58 estirpes de *S. aureus* de humanos foram analisadas quanto à presença do gene *agr* e os resultados demonstraram que 31 estirpes (53,4%) pertencem ao grupo 1, 20 (34,4%) ao grupo 2 e 5 (8,6%) ao grupo 3. Não foi detetada nenhuma estirpe pertencente ao grupo 4 e dois dos isolados não demonstraram um resultado positivo para nenhum dos quatro grupos. No grupo 1 encontravam-se estirpes com suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina, cefoxitina, linezolid e daptomicina. No grupo 2 verificou-se a presença de estirpes resistentes à ciprofloxacina, cefoxitina, daptomicina, vancomicina, teicoplanina e linezolid. As estirpes pertencentes ao grupo 3 eram suscetíveis a todos os antibióticos testados. Por outro lado, uma das estirpes sem grupo era suscetível a todos os antibióticos testados e a outra era apenas resistente à daptomicina (Tabela 26).

Os 17 *S. aureus* de origem veterinária não apresentaram genes *mecA* e *mecC*. A pesquisa do gene *agr* nestas estirpes identificou 3 (17,6%) pertencentes ao grupo 1, 3 (17,6%) do grupo 2, 7 (41,2%) do grupo 3, e 4 (23,5%) do grupo 4. Das quatro estirpes resistentes à ciprofloxacina, duas pertenciam ao grupo 3 e as outras duas ao grupo 4 (Tabela 26).

Procurou-se confirmar o fenótipo de resistência à cefoxitina das estirpes de *S. capitis* coletadas num lar e num hospital através da pesquisa dos genes *mecA* e *mecC*. Ambas as estirpes foram positivas para o gene *mecA*.

Na estirpe de *S. epidermidis* coletada no hospital 33 foi identificado o gene *mecA* e alterações no gene rRNA 23S (domínio V), mais especificamente a substituição T→A na posição 2531 e G→A na posição 2695 (Tabela 27).

Tabela 26. Relação entre o fenótipo e o genótipo das estirpes de *S. aureus* coletadas em humanos e animais.

Estirpe	Grupo agr	mecA	Mutações no rRNA 23S (domínio V)	Mutações no rlmN	Perfil de resistência
S. aureus coletados em humanos (n=58):					
Sa810	Grupo 1	-	G2603T, G2695A	T111G, T384C, C666T, A948G, A1035G	CIP, LNZ
Sa817	Grupo 2	+	G2695A	C666T, T675C, A948G, A1035G	FOX, CIP, LNZ
Restantes estirpes	Grupo 1	+/-	-	-	(CIP), (FOX), (DPC)
	Grupo 2	+/-	-	-	(CIP), (FOX), (DPC), (VA), (TP)
	Grupo 3	-	-	-	-
	Não tipável	-	-	-	(DPC)
S. aureus coletados em animais (n=17):					
-	Grupo 1	-	-	-	-
-	Grupo 2	-	-	-	-
-	Grupo 3	-	-	-	(CIP)
-	Grupo 4	-	-	-	(CIP)

Tabela 27. Relação entre o fenótipo e o genótipo da única estirpe de *S. epidermidis* isolada num indivíduo em ambiente hospitalar.

<i>S. epidermidis</i> isolado de humano	Hospital	Perfil de resistência	Teste GRD	mecA	Mutações no rRNA 23S (domínio V)
Sa796	33	CIP, FOX, TP, LNZ	hGISE	+	T2531A, G2695A

2.2. *Acinetobacter* spp.

Para as 15 estirpes de *A. baumannii* pesquisaram-se os genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51-tipo} e *bla*_{OXA-58}, pois poderiam justificar o fenótipo de suscetibilidade diminuída aos carbapenemes. Efetivamente, todas estas estirpes possuíam um gene *bla*_{OXA-51-tipo} (mais especificamente o gene *bla*_{OXA-66}) e o gene *bla*_{OXA-23}. Para as estirpes que apresentavam uma diferença maior ou igual a 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição do imipeneme e do imipeneme + DPA (Figura c do Anexo ii) pesquisaram-se os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM}. No entanto, como todas apresentaram ausência desses genes procedeu-se à realização do teste *Blue-Carba*, o qual também deu negativo. Para as estirpes que possuíam sinergia entre a ceftazidima e amoxicilina + ácido clavulânico + cloxacilina (Figura c do Anexo ii) pesquisaram-se genes como *bla*_{CTX-M-G1/2/9/8/25}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{VEB} e *ampC*, tendo os resultados sido negativos.

Também para as duas estirpes de *A. pittii* se pesquisaram os genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51-tipo} e *bla*_{OXA-58}, as quais apresentaram resultados negativos.

2.3. *Pseudomonas* spp.

Os genes *bla*_{OXA-50}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM} foram pesquisados nas estirpes de *P. aeruginosa*, sendo todas as 15 positivas para a presença do gene *bla*_{OXA-50} e 3 positivas para *bla*_{VIM} [estes identificados como *bla*_{VIM-2} (n=2) e *bla*_{VIM-11} (n=1)] (Tabela 28). A presença do gene *bla*_{VIM-11} numa estirpe confirmou o fenótipo MBL sugerido pela diferença de mais de 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição do imipeneme e do imipeneme + DPA e pelas sinergias do imipeneme + DPA com os carbapenemes (Figura d do Anexo ii). Também a presença do gene *bla*_{VIM-2} em 2 estirpes confirmou o fenótipo de MBL sugerido pelas sinergias entre IMP + DPA e os carbapenemes (Figura e do Anexo ii). Para duas estirpes com sinergia entre o ácido borónico e os carbapenemes pesquisaram-se os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NMC} e *bla*_{SME} e ambas apresentaram genes *bla*_{GES-7-tipo} (Figura f do Anexo ii) (Tabela 28). Para as estirpes com uma diferença igual ou superior a 5 mm, entre os halos da ceftazidima (30 µg) e ceftazidima + ácido clavulânico pesquisaram-se os genes *bla*_{PER}, *bla*_{CTX-M-G8/25}, *bla*_{VEB-tipo} e *bla*_{CTX-M-G1/2/9}; apenas uma revelou a presença do gene *bla*_{VEB}, confirmando assim o fenótipo de ESBL (Figura g do Anexo ii) (Tabela 28).

Por outro lado, a pesquisa dos genes *bla*_{OXA-50}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM} nas duas estirpes de *P. putida* (dos lares C e D) não identificou a presença dos mesmos.

Tabela 28. Relação entre o fenótipo e o genótipo das seis *P. aeruginosa* que possuíam os genes *bla*_{VEB-tipo}, *bla*_{VIM-2/11} e *bla*_{GES-7-tipo} isoladas de humanos em ambiente hospitalar.

Estirpe	Gene	Perfil de resistência	Sinergias	Diferenças de diâmetros ≥ 5 mm
19962	<i>bla</i> _{VEB-tipo}	FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, CIP, TMN, GEN, AN	IMP+DPA com carbapenemes; CAZ com AMC + cloxacilina	Entre CCAZ e CAZ
19996	<i>bla</i> _{VIM-2}	FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, CIP, TMN, GEN, AN	IMP+DPA com carbapenemes	-----
20018	<i>bla</i> _{VIM-2}	FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, CIP, TMN, GEN, AN	IMP+DPA com carbapenemes	-----
20185	<i>bla</i> _{VIM-11}	FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, CIP, TMN, GEN, AN	IMP+DPA com carbapenemes	Entre IMP + DPA e IMP
19940	<i>bla</i> _{GES-7-tipo}	FEP, IMP, CAZ, TPZ, MEM, CIP, TMN, GEN	IMP+DPA com carbapenemes; ácido borónico com carbapenemes	-----
20183	<i>bla</i> _{GES-7-tipo}	FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, CIP, TMN, GEN, AN	IMP+DPA com carbapenemes; ácido borónico com carbapenemes	-----

2.4. *Klebsiella oxytoca*

Na estirpe de *K. oxytoca* estudada foram pesquisados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *ampC*, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NMC}, *bla*_{SME}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac* e *qepA*, tendo-se identificado o gene *bla*_{OXY-5-tipo}. O PCR dos genes PMQR permitiu detetar o gene *qnrB*, no entanto, a posterior sequenciação identificou uma proteína de ligação ao DNA

pertencente a um prófago, possivelmente uma integrase (após pesquisa em bases de dados utilizando BLAST).

3. Ambiente genético do gene *bla*_{OXA-23}

Das várias combinações de *primers* ensaiadas (ver Tabela 12, secção 3.5. do Material e Métodos), aquela que compreendia os *primers* OXA-23R e ISAb1F permitiu a amplificação e sequenciação de ISAb1 associada ao gene *bla*_{OXA-23}. Esta IS encontrava-se a montante do gene *bla*_{OXA-23} em todas as estirpes de *A. baumannii* incluídas neste estudo e a sua estrutura-se representada na Figura 8.

A pesquisa de ISAb1 nas estirpes de *A. pittii* dos lares através de PCR revelou apenas a amplificação de bandas inespecíficas.



Figura 8. Representação esquemática dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-66} dos 15 isolados de *A. baumannii* e a sua associação com a sequência de inserção ISAb1. ISAb1 e o gene *bla*_{OXA-23} estarão provavelmente associadas ao transposão Tn2008-like, também representado.

4. Clonalidade e diversidade genética

4.1. Em *Staphylococcus aureus*

O estudo da diversidade genética de todas as estirpes de *S. aureus*, após análise de 7 *housekeeping genes*, utilizando o método de MLST, permitiu identificar doze ST diferentes entre as estirpes provenientes de indivíduos em hospitais (Tabela 29) e onze ST diferentes entre as estirpes com origem animal (Tabela 30). Na Figura 9 pode-se observar que apenas ST5 e ST34 se encontravam em ambos os reservatórios e que ST22 e ST105 foram os mais frequentemente identificados entre os isolados de humanos, enquanto que nos animais foi o ST121. Destaca-se ainda o facto de nas estirpes com origem animal se terem identificado três ST novos (ST3254, ST3269 e ST3270) devido à presença de alelos não descritos previamente.

Tabela 29. Associação entre o ST e o respetivo perfil alélico para os 12 ST identificadas em 58 isolados de *S. aureus* coletados em indivíduos a nível hospitalar.

ST	Perfil alélico						
	<i>arc</i>	<i>aro</i>	<i>glp</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqi</i>
ST5	1	4	1	4	12	1	10
ST8	3	3	1	1	4	4	3
ST15	13	13	1	1	12	11	13
ST22	7	6	1	5	8	8	6
ST25	4	1	4	1	5	5	4
ST30	2	2	2	2	6	3	2
ST34	8	2	2	2	6	3	2
ST45	10	14	8	6	10	3	2
ST72	1	4	1	8	4	4	3
ST105	1	4	1	4	12	1	28
ST239	2	3	1	1	4	4	3
ST718	19	122	12	2	13	84	15

Tabela 30. Associação entre o ST e o respetivo perfil alélico para os 11 ST identificados em 17 estirpes de *S. aureus* isoladas de animais.

ST	Perfil alélico						
	<i>arc</i>	<i>aro</i>	<i>glp</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqi</i>
ST1	1	1	1	1	1	1	1
ST5	1	4	1	4	12	1	10
ST9	3	3	1	1	1	1	10
ST34	8	2	2	2	6	3	2
ST121	6	5	6	2	7	14	5
ST130	6	57	45	2	7	58	52
ST398	3	35	19	2	20	26	39
ST2855	12	1	1	15	11	1	338
ST3254 ^a	355	2	2	2	6	3	72
ST3269 ^a	6	66	46	2	372	50	18
ST3270 ^a	6	66	46	2	373	50	18

^aST identificados pela primeira vez neste estudo.

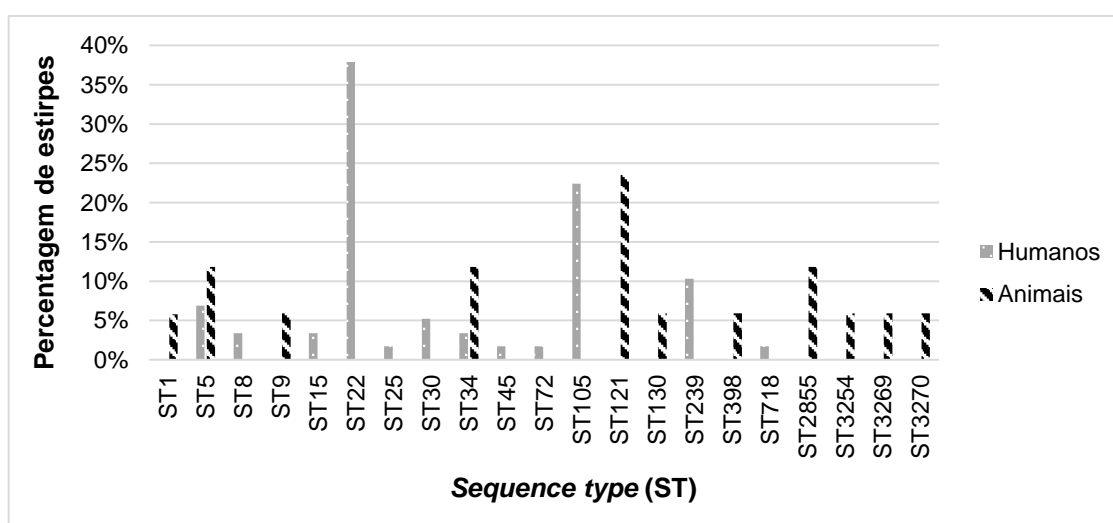


Figura 9. Distribuição dos vários ST identificados nos dois reservatórios estudados (humanos e animais).

A utilização do algoritmo eBURST permitiu agrupar os vários ST em complexos clonais (CC) de acordo com a semelhança entre os seus perfis alélicos e a possível descendência a partir de um mesmo genótipo fundador; nesta análise realizou-se a comparação entre os ST identificados neste estudo e os ST existentes na base de dados de MLST de *S. aureus*. Dentro de um complexo, os vários ST podem ser classificados em SLV se diferem do fundador em apenas um dos alelos (*Single-Locus Variants*) ou DLV se diferem do fundador em dois alelos (*Double-Locus Variants*).

Assim, o primeiro grupo aqui descrito era o mais complexo e diverso, englobando vários CCs que se encontravam anteriormente separados: CC5 (inclui ST5 e ST105), CC8 (engloba ST8 e ST239) e CC1, CC8, CC9, CC15, CC25 e CC72 que englobam, neste estudo, ST1, ST9, ST15, ST25 e ST72, respetivamente (Figura 10). O CC97 encontra-se representado na Figura 9, uma vez que representa a ligação aos CC1 e CC25, os quais incluem estirpes deste estudo.

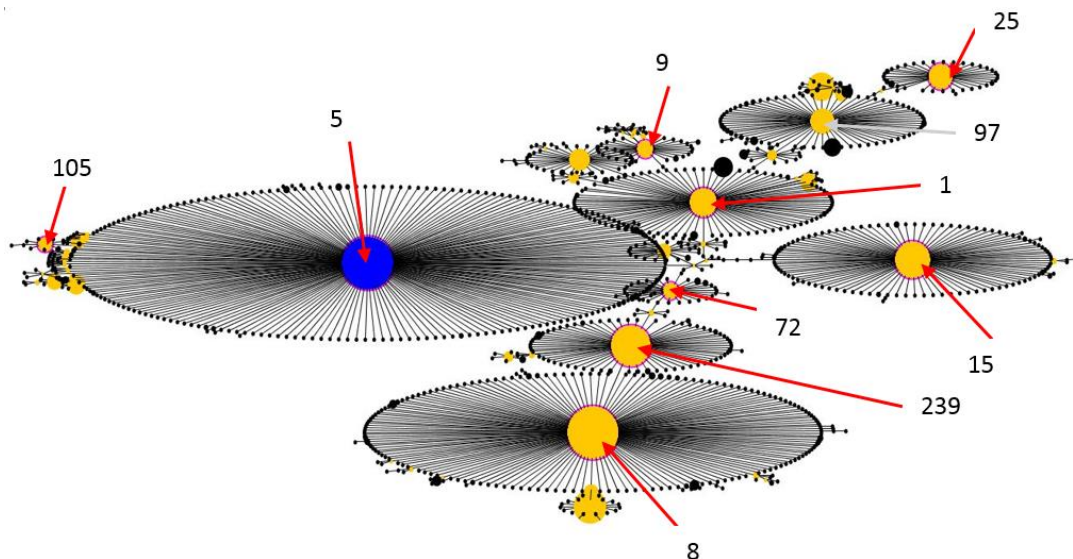
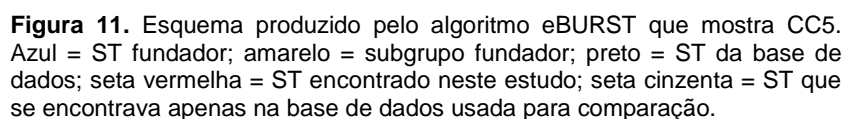


Figura 10. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que engloba o CC1, CC5, CC8, CC9, CC15, CC25 e CC97 num único grupo. Azul = ST fundador; amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; seta vermelha = ST encontrado neste estudo; seta cinzenta = ST que se encontrava apenas na base de dados usada para comparação.

Na Figura 11 pode observar-se o CC5, o qual engloba ST5 (identificado neste estudo em humanos e animais), sendo este o ST fundador (valor de *bootstrap* = 100%), e ST105 (encontrado neste estudo apenas em humanos) como um SLV de ST5. Numa análise mais pormenorizada podemos observar que ST105 deu origem aos seus próprios SLV (exemplo: ST1489), tornando-se assim num subgrupo fundador.



{ 59 }

Ainda no primeiro grupo (Figura 13), pode observar-se que CC8 (engloba ST8 e ST239 identificados, neste estudo, em humanos) estava geneticamente relacionado com o CC72 através do ST770 e ST861. Por fim, CC15 (engloba ST15 identificado, neste estudo, em humanos) encontra-se geneticamente relacionado com CC5 através do ST14, ST2372, ST1279, ST2605 e ST2750.

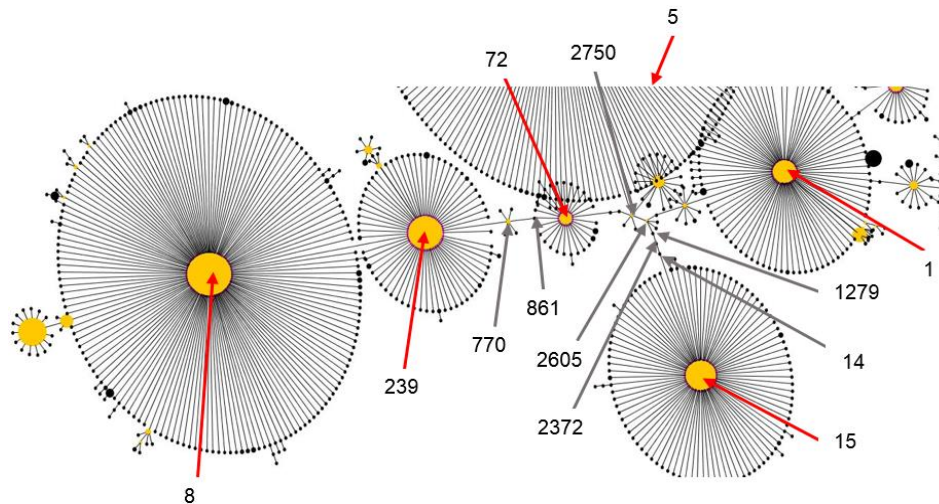


Figura 13. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que engloba o CC1, CC8 e CC15. Amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; seta vermelha = ST encontrado neste estudo; seta cinzenta = ST que se encontrava apenas na base de dados usada para comparação.

Um segundo grupo criado pelo algoritmo eBURST correspondia ao CC30 (Figura 14), o qual engloba ST30 (identificado, neste estudo, em humanos) como fundador (valor de *bootstrap* = 99%), o ST34 (identificado, neste estudo, em humanos e animais) como SLV e o ST3254 (ST novo identificado, neste estudo, em animais) como DLV do fundador. O ST34 é também um subgrupo fundador, tendo os seus próprios SLV, como o ST457 e o ST2042. O ST3254 encontrava-se geneticamente relacionado com o fundador do CC30 através do ST433.

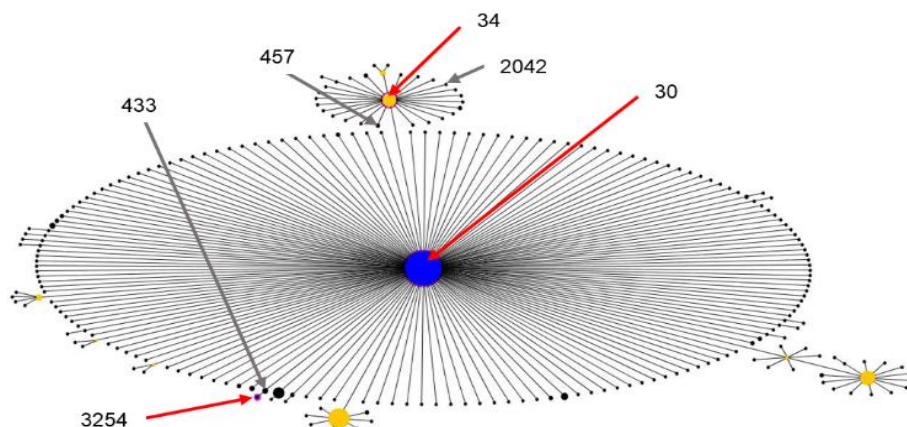


Figura 14. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC30. Azul = ST fundador; amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; seta vermelha = ST encontrado neste estudo; seta cinzenta = ST que se encontrava apenas na base de dados usada para comparação.

Num terceiro grupo encontrava-se o CC45 (Figura 15) com ST45 (identificado, neste estudo, em humanos) como fundador (valor de *bootstrap* = 99%). Existem vários SLV deste ST fundador, como por exemplo ST1878 e ST1664.

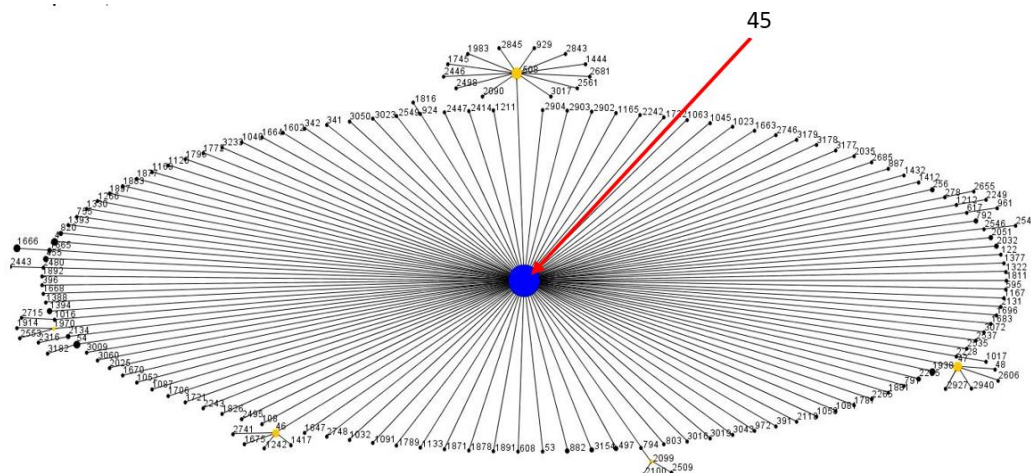


Figura 15. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC45. Azul = ST fundador; amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; seta vermelha = ST encontrado neste estudo.

Num quarto grupo encontrava-se o CC121 (Figura 16), com ST121 (coletado, neste estudo, em animais) como fundador (valor de *bootstrap* = 100%) e ST3063, bem como ST2336 como exemplos de SLV desse mesmo fundador.

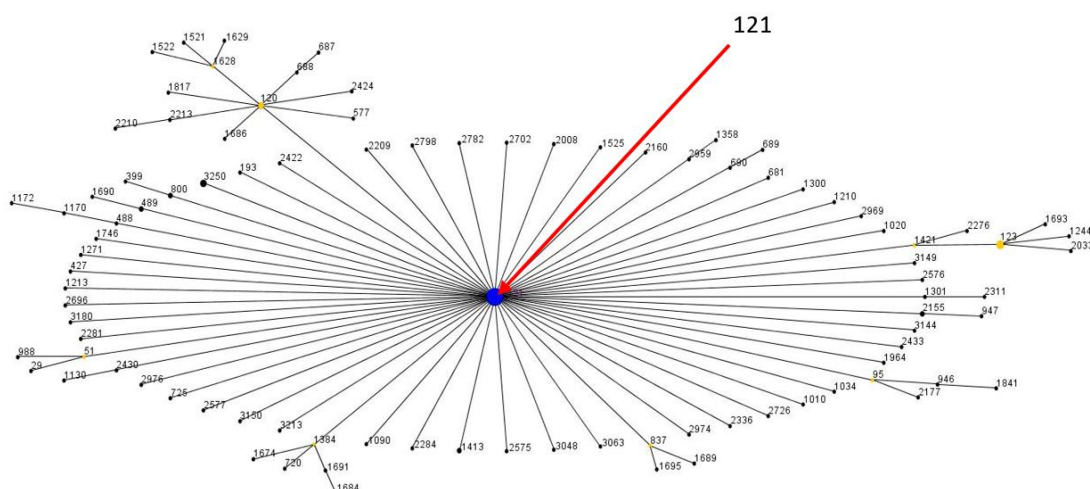
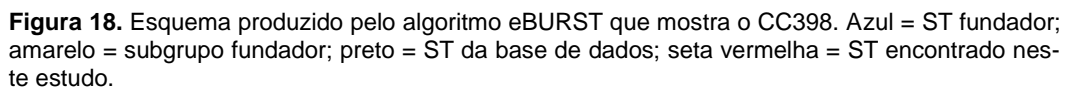
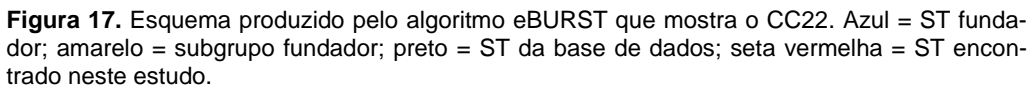


Figura 16. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC121. Azul = ST fundador; amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; seta vermelha = ST encontrado neste estudo.

O quinto grupo construído pelo algoritmo correspondeu ao CC22 (Figura 17), cujo fundador era o ST22 (isolado em humanos, neste estudo; valor de *bootstrap* = 100%). Como exemplos de SLV podemos referir ST495 e ST1060.



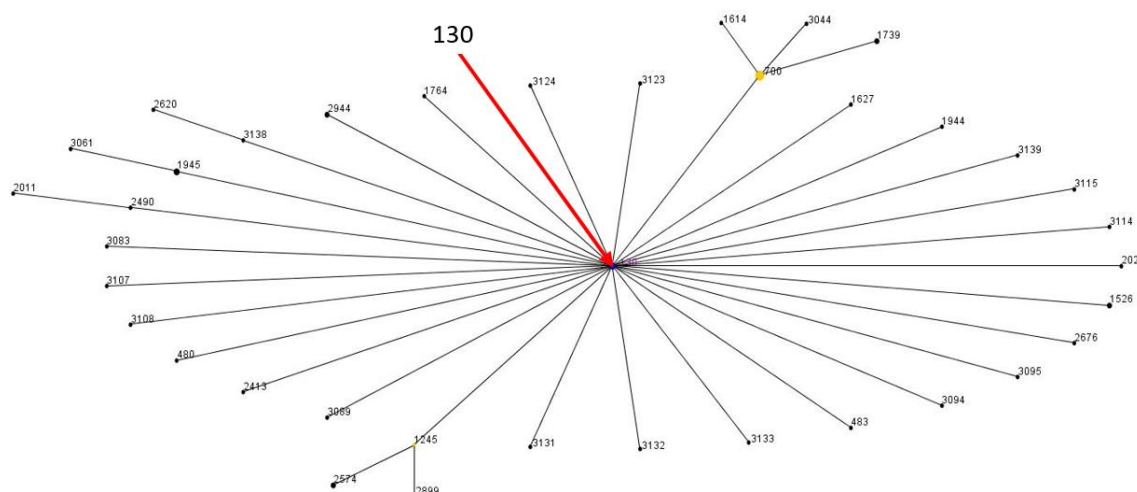


Figura 19. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC130. Azul = ST fundador; amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; seta vermelha = ST encontrado neste estudo.

O CC133 (Figura 20) integrou o grupo 10 do algoritmo e aí se identificou o ST133 como fundador (valor de *bootstrap* = 100%). ST3269 e ST3270 (ambos identificados, neste estudo, em animais), aqui descritos pela primeira vez, eram SLV de ST133.

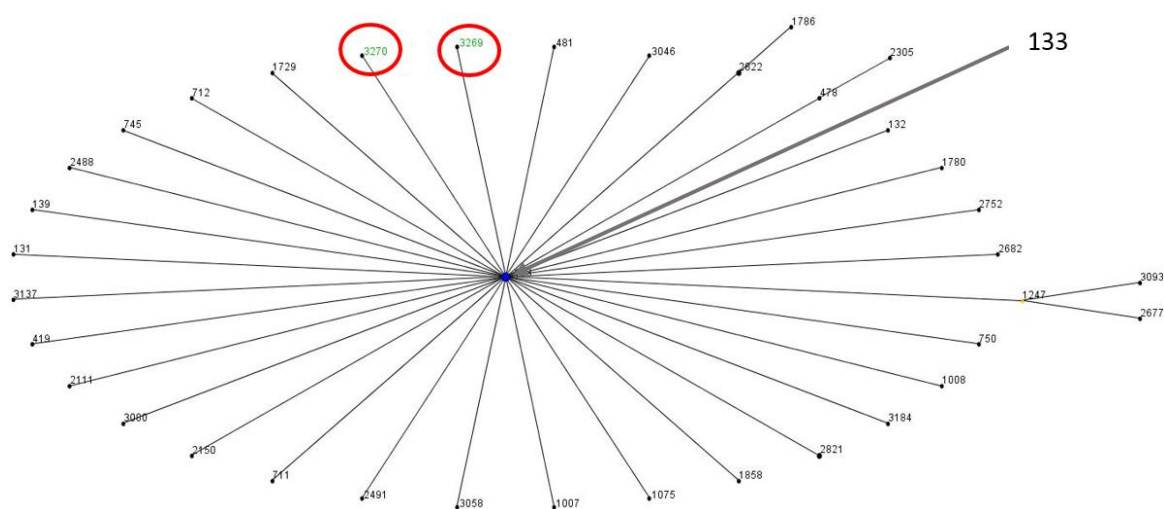


Figura 20. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC133. Azul = ST fundador; amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; círculo vermelho = ST encontrado neste estudo; seta cinzenta = ST que se encontrava apenas na base de dados utilizada para comparação.

O CC96 (Figura 21) englobava ST2855 (identificado, neste estudo, em animais) como SLV e ST3030 como DLV de ST96 (fundador com valor de *bootstrap* = 64%).

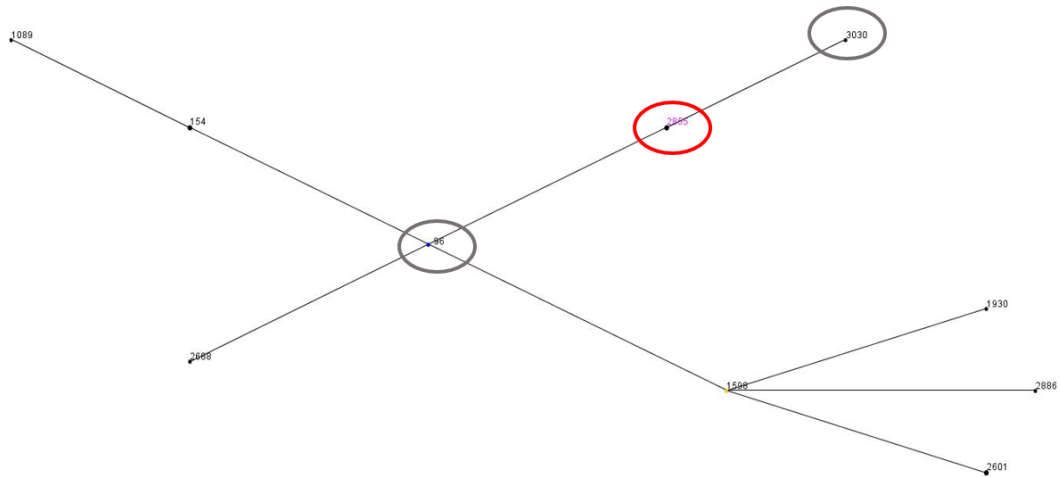


Figura 21. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o CC96. Azul = ST fundador; amarelo = subgrupo fundador; preto = ST da base de dados; círculo vermelho = ST encontrado neste estudo; círculo cinzento = ST que se encontrava apenas na base de dados utilizada para comparação.

O ST718, identificado, neste estudo, em estirpes de origem humana, encontrava-se geneticamente relacionado com ST643 e ST2735 (Figura 22) mas revelou valores de *bootstrap* demasiado baixos (34%) para ser considerado o fundador deste grupo.

Os grupos formados pelo algoritmo eBURST que não se encontram aqui descritos, não possuíam ST encontrados neste estudo.



Figura 22. Esquema produzido pelo algoritmo eBURST que mostra o ST718. Preto = ST da base de dados; círculo vermelho = ST encontrado neste estudo; círculo cinzento = ST que se encontrava apenas na base de dados utilizada para comparação.

Na tipagem de *S. aureus* utilizando o gene *spa* obtiveram-se 22 tipos de *spa* diferentes, para as estirpes humanas coletadas em hospitais (Tabela 31), entre os quais dois foram aqui descritos pela primeira vez (t14878 e t14933), e 11 tipos diferentes, para as estirpes isoladas de animais (Tabela 32), entre os quais também se identificou um novo tipo de *spa* (t15307). Em ambos os reservatórios foram identificados alguns tipos de *spa* que, apesar de

não serem novos, não foi possível identifica-los (NI). Nas estirpes humanas coletadas em hospitais, o tipo de *spa* mais frequentemente identificado foi o t032 seguido do t002, enquanto que nas estirpes coletadas em animais, o *spa* mais abundante foi um dos tipos de *spa* não identificados (NI 2). O NI 1 foi o único tipo de *spa* encontrado em ambos os reservatórios.

Tabela 31. Associação entre o tipo de *spa* e a respectiva sucessão de repetições para os 22 tipos de *spa* encontrados nos 58 isolados de *S. aureus* coletados de humanos em ambiente hospitalar.

Tipo de <i>spa</i>	Sucessão de repetições
t002 (n=7)	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
t008 (n=1)	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
t020 (n=1)	26-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t022 (n=2)	26-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t030 (n=1)	15-12-16-02-24-24
t032 (n=8)	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t037 (n=3)	15-12-16-02-25-17-24
t062 (n=1)	26-23-17-12-17-16
t078 (n=1)	04-21-12-41-20-17-12-12-17
t084 (n=2)	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
t104 (n=1)	11-10-34-22-25
t132 (n=1)	09-34-16-34
t148 (n=1)	07-23-12-21-12-17-20-17-12-12-17
t179 (n=1)	26-23-17-34-17-20-17-12-12-16
t688 (n=1)	26-23-17-34-17-16
t718 (n=1)	26-23-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t747 (n=4)	26-23-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
t910 (n=2)	26-23-23-13-23-31-29-17-25-16-28
t932 (n=1)	12-16-02-25-17-24
t1094 (n=3)	23-17-34-17-20-17-12-17-16
t1223 (n=1)	15-12-16-21-12-16-02-25-17-24
t1442 (n=1)	04-20-17-31-31-24-17-17-25
t2357 (n=2)	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-50-25-16-28
t4903 (n=3)	15-12-02-16-02-25-16-17-24
t5624 (n=1)	26-23-13-23-31-29-17-31-29-16-17-25-16-28
t10682 (n=2)	26-23-17-34-17-20-23-17-17-16
t14878^a (n=1)	04-44-34-16-44-34-16-12-25-22-34
t14933^a (n=1)	35-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28
NI 1 (n=1)	16-34-16-12-25-22-34

^aTipo de *spa* identificado pela primeira vez neste estudo. NI = Não identificado.

Tabela 32. Associação entre o tipo de *spa* e a respectiva sucessão de repetições para os 11 tipos de *spa* encontrados nas 17 estirpes de *S. aureus* isolados de animais.

Tipo de <i>spa</i>	Sucessão de repetições
t045 (n=2)	26-17-20-17-12-17-16
t337 (n=1)	07-16-23-23-02-12-23-02-34
t571 (n=1)	08-16-02-25-02-25-34-25
t748 (n=1)	15-12-17-24
t843 (n=1)	04-82-17-25-17-25-25-16-17
t1166 (n=1)	03-16-21-17-23-13-17-17-17-23-24
t1190 (n=2)	07-23-21-17-34-34-34-34-33-34
t15307^a (n=1)	26-23-12-21-17-34-25-17
NI 1 (n=2)	16-34-16-12-25-22-34
NI 2 (n=4)	13-12-17-23-18-17
NI 3 (n=1)	07

^aTipo de *spa* identificado pela primeira vez neste estudo. NI = Não identificado.

Na *minimum spanning tree* construída com base nos ST de *S. aureus* e nos tipos de *spa* (Figura 23), os *clusters* formados, correspondem, na sua maioria, aos CC obtidos pelo algoritmo eBURST. A exceção é um dos ST novos provenientes de *S. aureus* de animais, o ST3254, que é considerado através do algoritmo eBURST como parte do CC30, mas que na *minimum spanning tree* se encontra no mesmo *cluster* que os ST3269 e ST3270 (outros ST novos com origem em animais) do CC133.

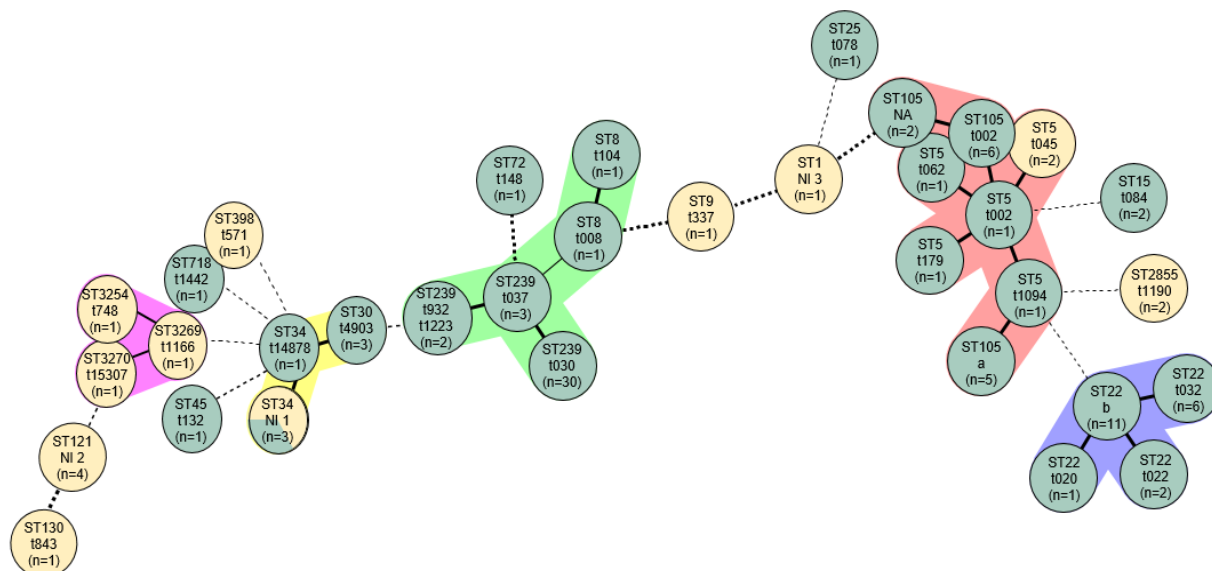


Figura 23. *Minimum spanning tree* com base nos vários ST e tipos de *spa* obtidos dos 75 *S. aureus* (de animais e humanos). Círculo amarelo = estirpes de veterinária. Círculo verde = estirpes humanas. Traço contínuo a **bold** = 1 alelo de diferença entre os ST. Traço contínuo simples = 2 alelos de diferença entre os ST. Tracejado a **bold** = 4 alelos de diferença entre os ST. Tracejado simples = mais de 4 diferenças. a = t688, t1094 e t10682. b = t718, t747, t910, t2357, t5624 e t14933.

Na Tabela 33 podem observar-se os vários genes estudados para as bactérias de *S. aureus* e os respetivos fenótipos.

Nos isolados de origem humana, a suscetibilidade diminuída à cefoxitina e à ciprofloxacina encontravam-se amplamente dispersas pelos vários tipos de *spa*, MLST e grupos *agr*. Não tão dispersa, a suscetibilidade diminuída à daptomicina encontrava-se, no entanto, associada a genótipos distintos: 8 tipos de *spa* (t032, t037, t084, t132, t747, t1094, t5624 e t10682), 6 ST (ST5, ST15, ST22, ST45, ST105 e ST239) e 3 grupos de *agr* (1, 2 e não tipável). Por outro lado, a resistência aos glicopeptídeos estava associada apenas ao *spa* t002, a um único ST, o ST105, e ao grupo 2 do gene *agr*. A resistência ao linezolid encontrava-se associada a dois tipos de *spa*, t1094 e t1223, dois ST, ST105 e ST239, e dois grupos *agr*, 1 e 2. Quanto aos tipos de *spa* novos, o t14878 encontrava-se associado a uma estirpe suscetível a todos os antibióticos ensaiados e o t14933 estava relacionado com uma estirpe resistente à cefoxitina e ciprofloxacina. Ainda nos isolados coletados em hospitais, obtiveram-se duas estirpes cuja região X_R do gene *spa* não foi possível amplificar e que pertenciam ao ST105, ao grupo 2 do *agr* e revelaram apenas suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina.

Nas estirpes de origem animal, a resistência à ciprofloxacina encontrou-se associada a dois tipos de *spa*, t1190 e NI 2, dois ST, ST2855 e ST121, e dois grupos *agr*, 3 e 4. O único *spa* novo neste grupo, o t15307, encontrava-se associado a um ST novo, o ST3270, pertencia ao grupo 1 do gene *agr* e era suscetível a todos os antibióticos testados. Os outros dois ST novos, o ST3254 e o ST3269, pertenciam a *spa* diferentes (t748 e t1166, respetivamente) e a grupos *agr* também diferentes (grupo 3 e 1, respetivamente), e tinham fenótipos de suscetibilidade a todos os antibióticos testados.

Tabela 33. Associação entre o genótipo e o fenótipo das 75 estirpes de *S. aureus* com origem em dois reservatórios distintos (humanos em hospitais e animais).

Tipo de spa	MLST	Grupo agr	mecA	Mutações no rRNA 23S (domínio V)	Mutações no rlmN	Perfil de resistência
S. aureus coletados em humanos (n=58):						
t002 (n=7)	ST5, ST105	Grupo 2	+	-	-	FOX, CIP, (TP), (VA)
t008 (n=1)	ST8	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t020 (n=1)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t022 (n=2)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t030 (n=1)	ST239	Grupo 1	-	-	-	CIP
t032 (n=8)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP, (DPC)
t037 (n=3)	ST239	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP, (DPC)
t062 (n=1)	ST5	Grupo 2	-	-	-	-
t078 (n=1)	ST25	Não tipável	-	-	-	-
t084 (n=2)	ST15	Grupo 2	-	-	-	(FOX), CIP, (DPC)
t104 (n=1)	ST8	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t132 (n=1)	ST45	Não tipável	-	-	-	DPC
t148 (n=1)	ST72	Grupo 1	-	-	-	-
t179 (n=1)	ST5	Grupo 2	+	-	-	FOX, CIP
t688 (n=1)	ST105	Grupo 2	-	-	-	CIP
t718 (n=1)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t747 (n=4)	ST22	Grupo 1	+/-	-	-	(FOX), CIP, (DPC)
t910 (n=2)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t932 (n=1)	ST239	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t1094 (n=3)	ST5, ST105	Grupo 2	+	G2695A/ -	C666T, T675C, A948G, A1035G/ -	FOX, CIP, (LNZ), (DPC)
t1223 (n=1)	ST239	Grupo 1	-	G2603T, G2695A	T111G, T384C, C666T, A948G, A1035G	CIP, LNZ
t1442 (n=1)	ST718	Grupo 2	-	-	-	-
t2357 (n=2)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
t4903 (n=3)	ST30	Grupo 3	-	-	-	-
t5624 (n=1)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP, DPC
t10682 (n=2)	ST105	Grupo 2	+	-	-	FOX, CIP, (DPC)
t14878 ^a (n=1)	ST34	Grupo 3	-	-	-	-
t14933 ^a (n=1)	ST22	Grupo 1	+	-	-	FOX, CIP
NI 1 (n=1)	ST34	Grupo 3	-	-	-	-
NA (n=2)	ST105	Grupo 2	-	-	-	CIP
S. aureus coletados em animais (n=17):						
t045 (n=2)	ST5	Grupo 2	-	-	-	-
t337 (n=1)	ST9	Grupo 2	-	-	-	-
t571 (n=1)	ST398	Grupo 1	-	-	-	-
t748 (n=1)	ST3254 ^b	Grupo 3	-	-	-	-
t843 (n=1)	ST130	Grupo 3	-	-	-	-
t1166 (n=1)	ST3269 ^b	Grupo 1	-	-	-	-
t1190 (n=2)	ST2855	Grupo 3	-	-	-	CIP
t15307 ^a (n=1)	ST3270 ^b	Grupo 1	-	-	-	-
NI 1 (n=2)	ST34	Grupo 3	-	-	-	-
NI 2 (n=4)	ST121	Grupo 4	-	-	-	(CIP)
NI 3 (n=1)	ST1	Grupo 3	-	-	-	-

^aTipo de spa identificado pela primeira vez neste estudo. ^bST identificado pela primeira vez neste estudo. NI = Não identificado. NA = Não amplificou. () = Algumas estirpes apresentaram suscetibilidade diminuída outras eram suscetíveis.

4.2. Em *Acinetobacter baumannii*

A interpretação dos resultados dos dois PCR *multiplex* utilizados para pesquisa dos clones internacionais I, II e III (grupos 2, 1 e 3, respetivamente) de *A. baumannii* permitiram detetar a dominância do clone internacional II, uma vez se encontrava associado a 13 estirpes (86,7%). Os dois únicos isolados que não pertenciam ao clone internacional II, não estavam relacionados com nenhum dos outros dois clones, pertencendo a um grupo 4. Estes dois isolados do grupo 4 não apresentaram qualquer diferença ao nível do perfil de suscetibilidade aos antibióticos nem da presença dos genes *bla*_{OXA-66} e *bla*_{OXA-23} e da sequência de inserção *IS**Aba1*, quando comparados com os outros isolados de *A. baumannii* estudados (Tabela 34).

A amplificação e sequenciação de sete *housekeeping genes* (por MLST) nas 15 estirpes de *A. baumannii* permitiu identificar um único perfil genético ou ST, o ST118.

Tabela 34. Associação entre o genótipo e o fenótipo das 15 estirpes de *A. baumannii* coletadas em hospitais.

Clone Internacional/grupo	MLST	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>IS</i> <i>Aba1</i>	Perfil de resistência
II/Grupo 1 (n=13)	ST118	+	+	+	DOR, IMP, MEM, CIP, (TMN), (GEN), (AN)
Grupo 4 (n=2)	ST118	+	+	+	DOR, IMP, MEM, CIP, TMN, GEN, AN

() = Algumas estirpes apresentaram suscetibilidade diminuída outras eram suscetíveis.

4.3. Em *Klebsiella oxytoca*

O resultado obtido através da técnica de PFGE, usada em 10 estirpes de *K. oxytoca* de lares e hospitais (Figura 24), permitiu concluir que a estirpe coletada no ambiente do lar C não se encontrava geneticamente relacionada com nenhuma das outras estirpes isoladas em hospitais. O lar em causa encontrava-se nas proximidades do hospital 34 deste estudo, no entanto, a única estirpe de *K. oxytoca* com suscetibilidade diminuída (21789) isolada nesse hospital possuía um perfil de resistência distinto, tendo apenas em comum a resistência à piperacilina.

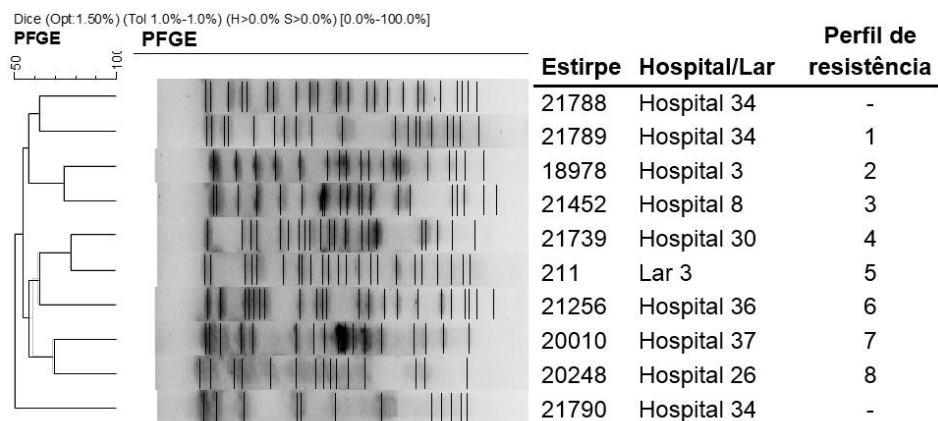


Figura 24. Resultados da técnica de PFGE usada em 10 estirpes de *K. oxytoca* de dois reservatórios distintos (lares e hospitais). 1 = SXT, PIP, CPT. 2 = AMP, ATM, CPD, FEP, CAZ, TPZ, MEM, ERT, FOX, CIP, OFX, LEV, SXT, PIP, TCC, CXM, CRO, CPT. 3 = AMP, ATM, CPD, FEP, CAZ, TPZ, FOX, CIP, OFX, LEV, PIP, TCC, CXM, CRO, CPT. 4 = AMP, ATM, CPD, FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, ERT, FOX, OFX, SXT, TMN, GEN, AN, PIP, TCC, CXM, CRO, CPT. 5 = AMP, TPZ, CIP, OFX, LEV, PIP. 6 = AMP, ATM, CPD, FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, ERT, FOX, CIP, OFX, LEV, SXT, TMN, GEN, PIP, TCC, CXM, CRO, CPT. 7 = AMP, ATM, CPD, FEP, DOR, IMP, CAZ, TPZ, MEM, ERT, FOX, SXT, TMN, GEN, AN, PIP, TCC, CXM, CRO, CPT. 8 = TPZ, PIP, TCC, CPT. - = estirpe suscetível a todos os antibióticos ensaiados.

IV. Discussão

A resistência aos antibióticos é um fenómeno complexo que envolve mecanismos de resistência díspares e afeta várias espécies e géneros bacterianos nos mais diversos ambientes, desde hospitais, comunidade e animais, tornando-se assim num crescente problema de saúde pública. Segundo um relatório da OMS de 2014, em algumas regiões do mundo, determinadas resistências aos antibióticos atingiram valores alarmantes, tendo poucas opções de tratamento disponíveis (OMS, 2014). Perante este cenário, torna-se indispensável a vigilância e a recolha de informação sobre os genes de resistência nos vários reservatórios, de modo a tentar conter ou até prevenir eventuais disseminações, facto que conduziu à elaboração deste trabalho.

Neste contexto, foram analisados dois reservatórios diferentes para as bactérias de *S. aureus*: humanos em hospitais e animais. As estirpes coletadas nos hospitais apresentaram uma predominância de resistência à cefoxitina e ciprofloxacina (Tabela 23), resultados que estão de acordo com outros estudos portugueses (Espadinha et al., 2013), assim como de outros países (Medina et al., 2013; Yildiz et al., 2014).

A meticilina foi introduzida na prática clínica com o objetivo de combater as estirpes de *S. aureus* resistentes à penicilina e tornou-se, juntamente com outros antibióticos β -lactâmicos, num dos antibióticos mais prescritos devido à sua especificidade e baixa toxicidade para as células humanas. Esta será, provavelmente, uma das razões que terá conduzido à rápida disseminação da suscetibilidade diminuída a este antibiótico, sendo atualmente pandémica (Deurenberg e Stobberingh, 2008; Tawil et al., 2013). Das 41 estirpes com resistência à cefoxitina, 40 possuíam o gene *mecA* e apenas uma se revelou negativa tanto para a presença de *mecA* como de *mecC*. Já foi descrita a ausência de genes *mec* em estirpes de *S. aureus* com valores de CIM para a oxacilina perto dos valores críticos (*Borderline oxacillin-resistant S. aureus* - BORSA). Neste caso, a resistência à cefoxitina/meticilina/oxacilina pode dever-se a uma elevada produção de uma penicilinase capaz de degradar lentamente estes antibióticos ou a alterações nos genes que codificam para as PBP conduzindo a substituições de aminoácidos no domínio da transpeptidase (Velasco et al., 2015). Uma explicação alternativa estará relacionada com mutações na zona de hibridação dos *primers* que impediram a amplificação destes genes.

No decorrer deste trabalho não foram encontradas estirpes MRSA entre as estirpes provenientes de animais, mas outros trabalhos já as descreveram, nomeadamente em porcos (Pomba et al., 2010) e bezerros (Couto et al., 2014) em Portugal, em animais selvagens como veados, cabras, abutres e javalis em Espanha (Porrero et al., 2013) e em golfinhos e morsas na América do Norte (Faires et al., 2009). Estes casos, apesar das taxas de prevalência de MRSA terem sido baixas, representam um fator de preocupação, não só para a

saúde animal, como também para a saúde humana, uma vez que estes animais podem servir como reservatórios de genes de resistência que podem, posteriormente, ser transmitidos ao Homem.

Perante infeções causadas por MRSA e em doentes incapazes de tolerar a vancomicina, as fluoroquinolonas (o terceiro antibiótico mais receitado em Portugal [ESAC, 2014]) tornaram-se uma das opções de tratamento (Espadinha et al., 2013; Hashem et al., 2013). Para este estudo não foram pesquisados os mecanismos de resistência à ciprofloxacina nas estirpes de *S. aureus*, no entanto, alguns estudos referem que nesta espécie o alvo primário é a topoisomerase IV (mais especificamente mutações no gene *parC*, também denominado *grlA*), o que normalmente conduz a níveis moderados de resistência. Estas mutações antecedem, habitualmente, outras mutações no gene *gyrA*. As estirpes com mutações em ambos os genes apresentam elevados níveis de resistência à ciprofloxacina. Um outro mecanismo de resistência às fluoroquinolonas em *S. aureus* diz respeito à expressão de uma bomba de efluxo da família MFS codificada no cromossoma, a NorA, que tem a capacidade de extrusão destes antibióticos, conferindo assim uma resistência de baixo nível (Hashem et al., 2013).

A resistência à cefoxitina e à ciprofloxacina encontra-se amplamente disseminada pelos vários tipos de *spa* nas estirpes coletadas em hospitais. Neste reservatório os *spa* mais frequentes foram t032 (ST22), seguido de muito perto por t002 (ST5/ST105), o que está de acordo com a frequência mundial destes *spa* (10,49% e 6,85%, respetivamente; <http://www.spaserver.ridom.de/>) e com estudos realizados em Portugal, tanto na comunidade (Simões et al., 2011) como em hospitais (Espadinha et al., 2013). Nos hospitais portugueses já foram descritas, até ao momento, diversas fases na disseminação clonal de MRSA: primeiramente, em 1992 e 1993, ocorreu a substituição do clone português ST239-t421 pelo clone ibérico ST247-t008/t051; em 1994 e 1995 surgiu a rápida disseminação do clone brasileiro multirresistente ST239-t037 (encontrado em três estirpes coletadas em hospitais neste estudo); posteriormente, este clone foi substituído pelo clone epidémico ST22-t032 e, pouco depois, apareceu o clone Nova-iorquino/japonês ST5-t067 e, mais recentemente, o ST105-t002 como os segundos mais predominantes (Tavares et al., 2014). Em relação aos outros clones encontrados neste estudo, a associação CC-ST-*spa* já tinha sido descrita para a maioria dos casos: o clone CC8-ST8-t008 em humanos e porcos na Noruega; o CC22-ST22-t020 e o CC5-ST5-t178 em hospitais e na comunidade em Portugal; o ST718-t1442 na Alemanha, o CC22-ST22-t718 na Escócia, o CC8-ST239-t932 na Malásia, o CC5-ST5-t062 nos EUA, o CC45-t132 no Líbano, o CC8-ST239-t030 na China, o CC8-ST8-t104 em Portugal e o CC22-ST22-t022 na Alemanha associados a hospitais; o CC5-t1094 em Espanha, o CC22-ST22-t747/t910/t2357 e o CC5-t10682 em Portugal e o CC25-t078 na China associados à comunidade; o CC15-ST15-t084 em hospitais na Suécia e em

porcos na Itália; o CC72-ST72-t148 em humanos, gorilas e chimpanzés no Gabão; e o CC5-t688 em gatos e na comunidade dos EUA (Strommenger et al., 2008; Soliman et al., 2009; Ghaznavi-Rad et al., 2010; Lin et al., 2011; Simões et al., 2011; Sunde et al., 2011; Sola et al., 2012; Tenover et al., 2012; Conceição et al., 2013; Espadinha et al., 2013; Nagel et al., 2013; Plano et al., 2013; Chen et al., 2014; Conceição et al., 2014; Harastani et al., 2014; Cuny et al., 2015; Lindqvist et al., 2015; Normanno et al., 2015). Realçam-se, no entanto, algumas exceções: os clones CC8-ST239-t1223, CC30-ST30-t4903 e CC22-ST22-t5624, para os quais não foi encontrada bibliografia para os tipos de *spa*, muito possivelmente por terem uma prevalência muito baixa a nível mundial; e os clones CC30-ST34-t14878 e CC22-ST22-t14933, porque foram aqui descritos pela primeira vez. As estirpes com origem na comunidade costumavam estar associadas ao ST1, ST8, ST30, ST72 e ST80, no entanto, com exceção do ST80, todos eles foram encontrados neste estudo em estirpes coletadas em hospitais. Efetivamente, um estudo de 2013 realizado em Portugal, demonstrou que as barreiras entre hospital e comunidade são cada vez menores e que na comunidade os ST mais frequentemente encontrados começam a ser também identificados em hospitais, principalmente o ST22 e o ST5/105 (Tavares et al., 2013).

Nas estirpes de *S. aureus* isoladas em animais, referem-se, igualmente, as associações CC-ST-*spa* que já tinham sido previamente descritas: o clone CC5-ST5-t045 em cães e gatos nos EUA (Lin et al., 2011), embora neste estudo tenha sido encontrado em caprinos; o CC9-ST9-t337 em porcos na Tailândia (Vestergaard et al., 2012), tal como nas estirpes aqui estudadas; o CC398-ST398-t571 em porcos e humanos no Canadá e nos EUA (Khanna et al., 2008; David et al., 2013), tendo sido encontrado num golfinho neste estudo; o CC130-t843 em humanos no Reino-Unido, França e Espanha, em cães no Reino-Unido e Alemanha, em bovinos no Reino-Unido, Dinamarca e França, entre outros (Paterson et al., 2014), tendo sido aqui encontrado numa ave de um zoo; e o CC133-t1166 numa cabra na Tunísia (Gharsa et al., 2015), tendo sido identificado num pato na nossa amostra. As exceções foram: o clone CC133-ST3270-t15307, porque foi aqui descrito pela primeira vez associado a um pato; o tipo de *spa* t748 (coletado num porco) associado a um novo ST, o ST3254 do CC30, anteriormente associado ao CC8-ST239 em hospitais na China (Chen et al., 2014); o *spa* t1190, já associado ao CC398 em coelhos na França e na Suíça (Mee-Marquet et al., 2014) e ao clone CC154-ST568 em humanos na Dinamarca (Gomes et al., 2006), neste estudo encontrava-se associado ao CC96-ST2855 em coelhos. Este estudo sobre *S. aureus* em animais permitiu identificar dois clones conhecidos por provocarem infeções em humanos e animais, o CC398-ST398-t571 e o CC130-t843. Efetivamente, ST398 é um dos ST mais preocupantes atualmente, pois já é considerado pandémico e em Portugal já foi identificado em estirpes MRSA responsáveis por infeções adquiridas na comunidade (Tavares et al., 2013). Não são só os isolados MRSA deste clone que causam infeções im-

portantes, pois já foram registados casos de septicémia e infeções da pele e tecidos moles causados por MSSA pertencentes ao ST398 (Mediavilla et al., 2012). Tal acontece, não só para este clone como também para outros. Um estudo de David et al. num hospital permitiu concluir que as infeções invasivas tinham uma probabilidade muito semelhante de ocorrer, quer se tratassem de doentes com MSSA ou MRSA. Por outro lado, havia uma maior probabilidade dos doentes com MSSA serem adultos, pacientes transplantados, estarem numa unidade de cuidados intensivos e sofrerem de endocardite, bacteriemia ou septicémia do que os pacientes com MRSA (David et al., 2011).

Para duas estirpes isoladas num hospital não foi possível a amplificação da região X_R da proteína A codificada pelo gene *spa*. Esta situação já foi descrita anteriormente e poderá dever-se a uma completa ausência do gene *spa* ou a deleções/inserções na região que codifica o domínio da proteína A de ligação à IgG, região esta que se encontra a montante da região X_R onde costuma hibridar o *primer forward*, impossibilitando assim a amplificação desta região (Baum et al., 2009; Votintseva et al., 2014). Uma tentativa de amplificação do gene *spa* completo poderia permitir verificar qual dos casos descritos anteriormente se aplica, tal como realizado por Votintseva et al.. Ambas as estirpes não tipáveis pertenciam ao ST105, um dos clones mais frequentemente associado a infeções hospitalares e adquiridas na comunidade, como já foi referido anteriormente.

Já as estirpes cujas regiões X_R foram amplificadas mas não puderam ser identificadas, NI1 (em humanos e animais), NI2 e NI3 (ambos em animais), pertenciam aos clones CC30-ST34, CC121-ST121 e CC1-ST1, respetivamente. O clone CC30-ST34 tem uma distribuição mundial e é frequentemente associado a infeções da pele e tecidos moles adquiridas na comunidade (Thomas et al., 2012). Nas estirpes de MSSA coletadas em coelhos, o clone CC121-ST121 mostrou-se predominante, assim como demonstrado num estudo de Smyth et al. (2009) (também em coelhos) e em MSSA deste clone que infetam humanos na Europa, Rússia e Ásia (Conceição et al., 2011). Como já foi mencionado, o CC1-ST1 encontra-se frequentemente associado à comunidade e neste estudo pertence a um MSSA coletado num coelho-crescente. Perante estes resultados podemos verificar, mais uma vez, que clones normalmente associados a infeções em humanos foram encontrados em animais, o que justifica a crescente preocupação existente em relação a possíveis transmissões de estirpes ou determinantes de resistência entre animais e humanos.

O *locus agr* atua na presença de uma elevada concentração extracelular de um péptido, denominado AIP (*Autoinducing peptide*), sendo esta concentração proporcional à densidade populacional bacteriana. A região variável deste *locus*, que compreende uma porção do C-terminal do AgrB, o AgrD e uma porção do N-terminal do AgrC, possui polimorfismos que permitem definir quatro grupos *agr*. Curiosamente, o AIP, segregado por determinado grupo, tem a capacidade de inibir a expressão de um *agr* de um grupo diferente presente

noutras estirpes, o que pode conduzir a cooperação entre estirpes pertencentes ao mesmo grupo *agr* e competição entre estirpes com grupos *agr* distintos. Considera-se, assim, que estirpes de *S. aureus* pertencentes a um mesmo grupo *agr* possuem propriedades biológicas semelhantes e uma estreita relação genética (Sakoulas et al., 2003; Purrello et al., 2014). Nas estirpes coletadas em humanos não foi encontrado o grupo 4 e o grupo 1 foi o mais prevalente, tal como num estudo realizado por Bibalan et al. (2014). Observou-se uma distribuição distinta nas estirpes coletadas em animais, uma vez que aqui o grupo predominante foi o 3, ao contrário de outros estudos como o de Smyth et al. (2009), e existiam representantes de todos os quatro grupos nesta amostra. Outros estudos demonstraram a predominância do grupo 3, mas em estirpes de MRSA provenientes de determinadas espécies de animais, como por exemplo de veados (Gómez et al., 2015) e de ovelhas (Gharsa et al., 2012).

Neste estudo, a suscetibilidade diminuída aos glicopeptídeos (estirpe hGISA incluída) encontrava-se exclusivamente associada ao clone ST5/ST105-t002-*agr* tipo 2, facto verificado também em estudos anteriores, como os de Sakoulas et al. (2003), Moise-Broder et al., (2004) e Purrello et al. (2014). Os mecanismos pelos quais tal acontece ainda não são claros, mas parece existir uma vantagem seletiva de alguns clones associados ao *agr* do grupo 2 perante uma pressão seletiva exercida pela presença de glicopeptídeos (Moise-Broder et al., 2004).

Perante os resultados obtidos, verifica-se que a suscetibilidade diminuída à daptomicina parece estar associada a clones muito bem adaptados ao ambiente hospitalar, como o CC22-ST22-t032 e o CC8-ST239-t037 [este último também associado a suscetibilidade diminuída à daptomicina num estudo desenvolvido por Wang et al. (2012a)]. A suscetibilidade diminuída à daptomicina foi também associada a um clone anteriormente descrito em hospitais e animais (o CC15-ST15-t084) e a clones associados à comunidade (CC5-ST105-t1094 e CC5-ST105-t10682), o que demonstra a sua dispersão por diversos ambientes. Quanto ao tipo de *agr*, a suscetibilidade diminuída à daptomicina apareceu associada ao grupo 1, 2 e a uma das estirpes não tipáveis. Para estas últimas não foi possível associá-las a nenhum grupo *agr*, uma vez que a região variável não foi amplificada pelos *primers* pan, *agr*1, *agr*2, *agr*3 e *agr*4 (Tabela 6). Tentou-se solucionar este problema utilizando outros *primers* (B1 e C2; Tabela 6) numa tentativa de amplificar o operão completo, no entanto, apenas se conseguiu obter uma porção deste, não permitindo a identificação do grupo *agr*. A pesquisa dos genes causadores da suscetibilidade diminuída à daptomicina (como os genes *mprF* e *walkR* e o operão *dlt* referidos na secção 1.2.1. da Introdução) por PCR, como por exemplo o realizado por Bayer et al. (2014) para o *mprF*, poderia permitir uma maior compreensão destes mecanismos de resistência, que ainda não são muito claros, e uma possível associação a clones específicos. Projeta-se efetuar esse estudo num futuro próximo.

As duas estirpes de *S. aureus* resistentes ao linezolid encontradas neste estudo estavam associadas a dois clones, o CC5-ST105-t1094-*agr* 2 e o CC8-ST239-t1223-*agr* 1. O primeiro clone pertence ao CC5 e também possuía um gene *mecA*, tal como em *S. aureus* com suscetibilidade diminuída ao linezolid estudados por Endimiani et al. (2011) e Locke et al. (2014). Ambos os clones possuíam a substituição G2695A no domínio V do gene rRNA 23S que, até onde foi possível apurar, se encontra aqui descrita pela primeira vez. O segundo clone possuía uma possível substituição adicional neste gene, G2603T, mas que não foi confirmada devido à existência de uma sobreposição de duas bases (G e T) nesta mesma posição. Isto poderá dever-se ao facto de existirem várias cópias deste gene e de algumas possuírem esta substituição e outras não. Esta substituição G2603T já se encontra descrita e associada à suscetibilidade diminuída ao linezolid (Lincopan et al., 2009; Endimiani et al., 2011; Ikeda-Dantsuji et al., 2011). Para as substituições encontradas no gene *rlmN* nestes dois clones de *S. aureus* com suscetibilidade diminuída ao linezolid (C666T, A948G, A1035G, T675C, T111G e T384C) não foram encontradas descrições prévias sobre as mesmas. O gene *rlmN* não é muito estudado em *S. aureus*, tendo sido encontrados apenas dois estudos, um em *S. aureus* que detetou a inserção de um codão neste gene associada à suscetibilidade diminuída ao linezolid (Gao et al., 2010) e um em *S. capitis* que registou mutações neste gene (Takaya et al., 2014), mas nenhuma correspondia às encontradas no decorrer deste trabalho.

As bactérias *S. epidermidis* são comensais, frequentemente encontradas em mucosas e pele de humanos e são consideradas, atualmente, como bactérias patogénicas oportunistas relevantes (Cherifi et al., 2013). O isolado multirresistente de *S. epidermidis* do hospital 33 tem uma substituição no domínio V do gene rRNA 23S em comum com os dois isolados de *S. aureus*, G2695A, mas tem também uma outra substituição distinta das descritas anteriormente, T2531A, que é, muito provavelmente, aqui descrita pela primeira vez. O isolado de *S. epidermidis* e os dois isolados de *S. aureus* com suscetibilidade diminuída ao linezolid pertencem a três hospitais diferentes e a duas zonas distintas do país. O isolado de *S. epidermidis* de hospital revelou-se também positivo para o gene *mecA* e é um hGISE. Tanto as estirpes hGISA/GISA como as hGISE/GISE representam um desafio em termos de diagnóstico e terapêutica, uma vez que podendo dar um fenótipo de suscetibilidade podem induzir o médico em erro na altura da prescrição da terapêutica mais adequada (Tevell et al., 2014). Uma investigação desenvolvida por Tevell et al. (2014) revelou uma elevada prevalência de hGISE em isolados responsáveis por infeções associadas a próteses articulares na Suécia.

Tal como *S. epidermidis*, *S. capitis* pode ser encontrado na mucosa e pele de humanos e, adicionalmente, no intestino. São bactérias patogénicas oportunistas e, apesar de serem ainda relativamente raras em ambiente hospitalar, já existem descrições de septicé-

mia em neonatos de cuidados intensivos (Rasigade et al., 2012), meningites (Oud, 2011) e endocardites em adultos (Takano et al., 2011) causadas por esta bactéria. Ambas as estirpes de *S. capitis* (uma coletada num hospital e a outra num lar) apresentaram o mesmo perfil de resistência, possuíam o gene *mecA* e estavam relacionadas geograficamente, o que permite sugerir poder tratar-se de um clone relacionado e, conseqüentemente, resultante de uma possível transferência entre hospital e lar, ou vice-versa. Para confirmar esta suspeita deveria proceder-se à aplicação do método de PFGE, para avaliação da clonalidade.

Das restantes estirpes de Gram positivo encontradas nos lares (n=9), apenas duas (22,2%) de *S. haemolyticus* revelaram suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina. A pesquisa dos genes de resistência responsáveis por esta suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina nas duas estirpes de *S. haemolyticus* e na estirpe de *S. capitis* encontradas no mesmo lar, poderia fornecer alguma informação sobre a eventual transferência destes genes de resistência entre estas bactérias de coagulase negativa, as quais são reconhecidas como reservatórios importantes. Assim, igual comparação desses resultados com os de *S. aureus* coletados em hospitais permitirá compreender se estas espécies de *Staphylococcus* de coagulase negativa são, efetivamente, reservatórios de genes de resistência relevantes a nível nosocomial. As bactérias de *S. haemolyticus* têm a capacidade de colonizar as mucosas e a pele humanas e são as segundas (dentro do grupo dos *Staphylococcus* de coagulase negativa) mais frequentemente isoladas em amostras clínicas sanguíneas (Silva et al., 2013; Pereira et al., 2014). Esta espécie já foi também associada a infeções causadas por estirpes resistentes ao linezolid em hospitais (Chamon et al., 2014).

As outras bactérias de Gram positivo coletadas em lares (*S. hominis*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *M. luteus*) eram suscetíveis a todos os antibióticos testados, no entanto, já foram associadas a infeções noutros estudos (Campoccia et al., 2010; Dib et al., 2013; Chamon et al., 2014; Wipf et al., 2014). Neste estudo não foram encontradas muitas suscetibilidades diminuídas nas amostras de lares, ao contrário do demonstrado por outros trabalhos (Chen et al., 2012; Donk et al., 2013;), no entanto, as amostragens foram diferentes no que diz respeito ao tamanho e ao tipo da amostra, uma vez que neste caso se tratavam de bactérias coletadas no ar destes lares e não diretamente dos indivíduos que frequentavam os mesmos (idosos ou pessoal médico).

A estirpe de *Exiguobacterium acetylicum* isolada no hospital 34 era apenas resistente à daptomicina, o que pode não representar um fator de grande preocupação, uma vez que uma infeção causada por esta bactéria poderá ser tratada com todos os outros antibióticos testados. Curiosamente, esta estirpe não é característica de hospitais, mas sim do meio ambiente, embora o género *Exiguobacterium* já tenha sido isolado de algumas amostras clínicas de humanos (Tena et al., 2014). Esta bactéria de Gram positivo é catalase e oxidase positiva e inibe o crescimento de fungos habitualmente patogénicos de plantas (Selvakumar

et al., 2009). Não existe muita informação sobre a suscetibilidade aos antibióticos nesta espécie e, por isso, a resistência à daptomicina poderá ser uma resistência intrínseca ou adquirida. Já foi registado um caso de bacteriemia causado por esta bactéria em Israel e verificou-se que a estirpe era sensível às penicilinas, cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos (Keynan et al., 2007).

Quanto às bactérias de Gram negativo, 14 em 15 *A. baumannii* eram multirresistentes, com suscetibilidades diminuídas aos carbapenemes, quinolonas e aminoglicosídeos, todos eles antibióticos de eleição para o tratamento de infeções causadas por *A. baumannii*. Para este estudo não foram pesquisados os genes responsáveis pelas suscetibilidades diminuídas às quinolonas e aminoglicosídeos mas, nesta espécie, a resistência às quinolonas costuma estar associada a mutações nos genes *gyrA* e *parC* e efluxo. Por outro lado, a suscetibilidade diminuída aos aminoglicosídeos deve-se normalmente à produção de enzimas que hidrolisam estes antibióticos (Karah et al., 2012). A suscetibilidade diminuída aos carbapenemes verificada em todas as estirpes resulta da expressão dos genes *bla_{OXA-66}* e *bla_{OXA-23}*; este último possui uma sequência de inserção (*ISAb₁*) a montante, a qual terá aumentado a expressão do gene *bla_{OXA-23}* através do seu próprio promotor (de *ISAb₁*), controlando a transcrição do gene da carbapenemase. Esta IS é a mais frequentemente associada a genes *bla_{OXA}* e parece desempenhar um papel importante na mobilização destes genes, estando muitas vezes associada a diversos transposões (Evans e Amyes, 2014). Neste estudo, uma vez que se identificou *ISAb₁* apenas a montante do gene *bla_{OXA-23}*, é muito provável que esta IS e este gene se encontrem associados ao transposão Tn2008. O gene *bla_{OXA-23}* encontra-se disseminado por hospitais de todo o mundo (Mugnier et al., 2010). Verificou-se que, por vezes, os fenótipos de MBL e de ESBL não tinham correspondência com o genótipo (PCR ou Blue-Carba negativos), o que pode dever-se a uma MBL ou ESBL que não foram pesquisadas neste estudo ou a uma sobre-expressão dos genes *bla_{OXA}* ou da *ampC* cromossómica presente nesta espécie, respetivamente.

Todos os isolados de *A. baumannii* pertenciam ao mesmo tipo de sequência, ST118, o que poderá confirmar a substituição de ST92 e ST98, anteriormente descritos em Portugal, o que já foi sugerido anteriormente (tendo sempre que se analisar uma amostra maior para ter a certeza) (Manageiro et al., 2012). Os mesmos autores sugeriram que esta substituição se poderia dever a dois eventos: a uma evolução do ST118 a partir dos clones ST98 e ST92 seguida de uma expansão geográfica, uma vez que estes três tipos de sequências pertencem ao mesmo CC, logo poderão ter tido uma disseminação sequencial; ou a uma importação do ST118 de outros países europeus e aquisição de genes de resistência, como o *bla_{OXA-23}*, seguida também de expansão geográfica. Este clone já foi descrito noutros países, como Itália (Ansaldi et al., 2011) e China (Li et al., 2015), e pode estar associado a infeções adquiridas em hospitais ou na comunidade (Manageiro et al., 2012). Com exceção de

dois isolados do grupo 4 [grupo descrito anteriormente por Towner et al. (2008) na Europa], todas as outras estirpes de *A. baumannii* pertenciam ao clone internacional II (grupo 1). Este clone (II) encontra-se normalmente associado ao CC92 (CC predominante a nível mundial e do qual faz parte o ST118) e ao gene *bla*_{OXA-66} (Karah et al., 2012). Neste estudo identificou-se a mesma associação.

As estirpes de *A. baumannii* apresentam uma grande diversidade de carbapenemases OXA, semelhante ao que ocorre com as ESBL em *Enterobacteriaceae*, o que faz com que o controlo da sua disseminação seja complexo (Evans e Amyes, 2014).

As estirpes de *Acinetobacter* spp. coletadas em lares não revelaram suscetibilidades diminuídas, demonstrando que, possivelmente, não serão estirpes preocupantes em termos de reservatórios de genes resistência nos lares analisados, embora se deva ter sempre em conta a pequena dimensão da amostra. No entanto, estas estirpes têm capacidade de adquirir alguns determinantes de resistência, nomeadamente *bla*_{OXA} e *bla*_{MBL}, sendo necessária vigilância (Fernández-Cuenca et al., 2012; Figueiredo et al., 2012; Wang et al., 2012b; Zhou et al., 2012; Cayô et al., 2014; Kaase et al., 2014).

Das 15 *P. aeruginosa* coletadas em hospitais, 10 apresentaram um fenótipo de multirresistência com suscetibilidade diminuída aos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, tal como observado noutras partes do mundo (McGowan, 2006; Sekiguchi et al., 2007; Yousefi et al., 2012; Gomila et al., 2013); estes representam os antibióticos mais usados para tratamento de infeções causadas por este organismo (Aghamiri et al., 2014).

Em *P. aeruginosa* a suscetibilidade às quinolonas está não só associada a mutações nos genes que codificam para a DNA girase e a topoisomerase IV, mas também à expressão de bombas de efluxo. Estas bombas de efluxo parecem também desempenhar um papel importante na suscetibilidade aos aminoglicosídeos nesta espécie, assim como a produção de enzimas que hidrolisam estes antibióticos (McGowan, 2006).

Todas as estirpes de *P. aeruginosa* obtiveram um resultado positivo para a presença do gene *bla*_{OXA-50-tipo}, um gene ubiquitário nesta espécie e que nos auxilia na sua identificação (Empel et al., 2007). Duas destas estirpes revelaram a presença de um gene *bla*_{GES-7-tipo}, que codifica uma ESBL (GES-7). Das restantes três estirpes com um fenótipo de ESBL, apenas uma revelou possuir um gene *bla*_{VEB-tipo} (*Vietnamese extended-spectrum β -lactamase*). O gene *bla*_{VEB-1} e as variantes *bla*_{VEB-1a}, *bla*_{VEB-1b} e *bla*_{VEB-2} já foram isolados em *P. aeruginosa* em alguns países, como França, Reino-Unido, Índia, Irão, Tailândia e Kuwait, e encontram-se, normalmente, associados a integrões e plasmídeos (Naas et al., 2006; Zhao e Hu, 2010). O fenótipo de ESBL nas duas restantes estirpes pode dever-se a um gene *bla*_{ESBL} não pesquisado neste estudo ou a uma sobre-expressão da *ampC* cromossómica da espécie em causa.

O fenótipo da grande maioria das estirpes de *P. aeruginosa* (n=14) indicava a possível presença de uma MBL, no entanto, em apenas três delas foram amplificados os genes *bla*_{VIM-tipo} (duas com *bla*_{VIM-2} e uma com *bla*_{VIM-11}). Os fenótipos aos quais não foi possível corresponder uma MBL podem representar um falso positivo devido à presença do gene *bla*_{OXA-50-tipo}. O gene *bla*_{VIM-2}, tal como já foi referido [secção 1.2.4.2. (C)], apresenta uma ampla dispersão por todo mundo e já foi isolado nas mais diversas espécies bacterianas, muitas delas relevantes a nível hospitalar, como *A. baumannii*, indicando transferência horizontal deste gene (Zhao e Hu, 2011). Por outro lado, o gene *bla*_{VIM-11} difere do *bla*_{VIM-2} numa única mutação não sinónima e tem uma distribuição mais limitada, tendo sido encontrado apenas na Argentina, Itália, Taiwan, Índia e Malásia (Marchiaro et al., 2008; Khosravi et al., 2010). Até onde a pesquisa bibliográfica permitiu apurar, esta será a primeira descrição deste gene em Portugal. Os genes *bla*_{VIM} encontram-se normalmente em integrões de classe 1 que, por sua vez, estão usualmente associados a transposões, os quais podem estar contidos no cromossoma ou em plasmídeos, contribuindo para a disseminação mundial deste mecanismo de resistência (Zhao e Hu, 2011; Jayanthi e Jeya, 2014). Estes genes aparecem, muitas vezes, associados a outros genes de resistência, como enzimas de hidrólise de aminoglicosídeos, contribuindo assim para o fenótipo de multirresistência (Viedma et al., 2012).

Quando há multirresistência (incluindo a suscetibilidade diminuída aos carbapenemes) o tratamento de infeções causadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* fica limitado a antibióticos como a colistina e a tigeciclina (apenas para *A. baumannii*), que provocam uma maior toxicidade nos humanos (Evans e Amyes, 2014; Kaewpoowat e Ostrosky-Zeichner, 2015).

Foram encontradas duas estirpes de *P. putida* em lares com um fenótipo de suscetibilidade intermédia ao meropeneme e resistência à associação piperacilina + tazobactame. Não foram encontrados genes *bla*_{MBL} que pudessem ser responsáveis pelo fenótipo de suscetibilidade intermédia ao meropeneme. Estes resultados podem dever-se à expressão de uma β -lactamase não pesquisada neste estudo (por exemplo, classe A/D e família TEM/SHV, respetivamente) ou a outro mecanismo de resistência, como PBP alteradas, redução de porinas na membrana externa e bombas de efluxo. Estas bactérias são características da água e solo e têm uma grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, no entanto, já foram associadas a infeções em pessoas imunocomprometidas e à colonização de cateteres e tubos de drenagem, nomeadamente em França, Itália, Japão e EUA. Nestas infeções associadas ao ambiente nosocomial, a suscetibilidade diminuída aos antibióticos β -lactâmicos é, normalmente, o fenótipo mais frequente (Bogaerts et al., 2008; Molina et al., 2014). Um estudo realizado por Juan et al., (2010) conclui que as estirpes de *P. putida* poderão servir como reservatórios de genes de resistência, nomeadamente *bla*_{MBL} localizados

em plasmídeos, que podem ser eficazmente transferidos para *P. aeruginosa*. Existe uma relação de proximidade geográfica entre um dos lares onde foi coletada uma das estirpes com um fenótipo intermédio ao meropeneme e o hospital 27, onde foi isolada uma *P. aeruginosa* multirresistente, o que constitui um fator de preocupação, pois a transferência de genes de resistência entre ambientes distintos é cada vez mais frequente.

As *P. fluorescens* são bactérias de Gram negativo encontradas, frequentemente, na água e solo, bem como na pele, boca, pulmões e estômago do Homem (Maravić et al., 2012; Scales et al., 2014). A estirpe de *P. fluorescens* encontrada num lar era suscetível a todos os antibióticos testados e não expressava a AmpC cromossômica característica desta espécie. Esta AmpC é indutível, o que leva a crer que esta bactéria não terá sofrido pressão seletiva imposta por um antibiótico β -lactâmico. No entanto, a estirpe proveniente de um hospital revela que esta espécie tem a capacidade de adquirir alguns determinantes de resistência, nomeadamente aos carbapenemes e aminoglicosídeos, como demonstrado também por outros estudos (Koh et al., 2004; Pellegrini et al., 2009).

A espécie *K. oxytoca* faz parte da família *Enterobacteriaceae* e engloba bactérias patogénicas oportunistas (Fujita et al., 2015). A *K. oxytoca* coletada num dos lares incluídos neste estudo não se encontrava geneticamente relacionada com as outras estirpes de *K. oxytoca* isoladas em hospitais. A presença de um gene *bla*_{OXY-5-tipo} (na estirpe do lar) é responsável pela resistência intrínseca desta bactéria à ampicilina e uma eventual sobre-expressão deste mesmo gene poderá estar relacionada com a sinergia entre ceftazidima + ácido clavulânico e ampicilina e com o fenótipo de suscetibilidade intermédia à piperacilina e à associação piperacilina + tazobactame, como descrito anteriormente (Fujita et al., 2015). Esta sobre-expressão ocorre normalmente devido a mutações pontuais no promotor deste gene (Tsakris et al., 2011). Outra possível explicação para este fenótipo de ESBL é a presença de uma ESBL não estudada no presente trabalho. Não foram encontrados genes que pudessem estar relacionados com a suscetibilidade diminuída desta estirpe às quinolonas, podendo esta dever-se a outro gene não analisado como, por exemplo, os genes *oqxA* e *oqxB* que codificam uma bomba de efluxo (OqxAB) que já foi associada à suscetibilidade diminuída a estes antibióticos (Andres et al., 2013). Diversas estirpes de *K. oxytoca* já foram reportadas como causas de surtos em vários países como a Áustria (Leitner et al., 2015), Espanha (Conejo et al., 2010), Turquia (Mete et al., 2013), Argentina (Zárate et al., 2008) e França (Decré et al., 2004).

As restantes bactérias de Gram negativo coletadas nos lares (*P. oryzihabitans*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Pantoea spp.*) revelaram-se suscetíveis a todos os antibióticos ensaiados. No entanto, embora sejam casos raros, estas estirpes têm a capacidade de adquirir genes de resistência e causar doença no Homem (Blaak et al., 2014; Nei et al., 2015; Mohan and Railey, 2015).

V. Conclusão

Neste estudo avaliou-se a suscetibilidade aos antibióticos de 139 estirpes bacterianas coletadas em hospitais, ambiente de lares e animais.

Em *S. aureus* coletados em hospitais, predominava a suscetibilidade à ciprofloxacina (82,8%) e cefoxitina (70,7%), esta última causada pela expressão do gene *mecA*. Num país como Portugal, com uma elevada taxa de MRSA (ECDC, 2013), é necessária a implementação de estratégias não só nos hospitais, mas também em instituições prestadoras de cuidados de saúde (como os lares) e na área da veterinária de forma a reduzir a disseminação desta bactéria, a qual constitui um problema de saúde pública na atualidade. Foram ainda registadas suscetibilidades diminuídas à vancomicina, teicoplanina, daptomicina e linezolid, que, apesar de se encontrarem pouco disseminadas, são preocupantes, especialmente no que diz respeito à daptomicina e linezolid, antibióticos de “última linha” no tratamento de infeções causadas por *S. aureus*. Foram ainda encontrados dois tipos de *spa* novos (t14878 e t14933) nas estirpes de *S. aureus* isoladas em hospitais e um tipo de *spa* (t15307) e três ST novos (ST3254, ST3269 e ST3270) nas estirpes coletadas de animais. Tipos de *spa* e ST em comum em hospitais e lares demonstram a disseminação de clones entre diferentes reservatórios, neste caso, entre hospital e animais ou vice-versa.

Foi identificado um fenótipo e genótipo semelhantes entre uma estirpe de *S. capitis* de um hospital e de um lar. Ambas as instituições podem servir como reservatórios de genes de resistência e estudos mais detalhados estão previstos para avaliar a possível relação genética e disseminação entre reservatórios, nomeadamente por Sequenciação de Nova Geração.

Nas bactérias de Gram negativo coletadas em hospitais predominaram os fenótipos de multirresistência, incluindo a suscetibilidade diminuída aos carbapenemes, o que diminui as opções de tratamento disponíveis para infeções causadas por estas bactérias. Em *A. baumannii* foi encontrado o gene ubiquitário *bla*_{OXA-66}, que confere resistência intrínseca àqueles, e *bla*_{OXA-23}, cuja resistência adquirida aos carbapenemes é conferida num nível mais elevado do que o gene *bla*_{OXA-66}. Foi igualmente identificado o MGE *ISAbal*, assinalando a facilidade de disseminação desta resistência. Em *P. aeruginosa* identificaram-se dois genes *bla*_{GES-7-tipo}, um *bla*_{VEB-tipo}, dois *bla*_{VIM-2} e um *bla*_{VIM-11} (este último descrito pela primeira vez em Portugal).

Nos lares foram encontradas, na sua maioria, bactérias com pouca relevância a nível nosocomial, mas cuja vigilância e estudo não deve ser negligenciado, uma vez que estas estirpes podem funcionar como reservatórios de genes de resistência.

É necessário não só um maior conhecimento dos mecanismos de resistência, mas também uma educação do público em geral, veterinários e trabalhadores do sistema de sa-

úde, de modo a promover um correto uso dos antibióticos e serem tomadas medidas de higiene e segurança. É essencial também a regulação de atividades como a aquacultura, agricultura e criação de animais que usam muitas vezes antibióticos da mesma classe dos usados para consumo humano (Laxminarayan et al., 2014).

Neste trabalho foi possível o estudo de alguns dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e oxazolidinonas, ficando muitos outros mecanismos por investigar devido à vastidão do tema. Assim, a extensão e complexidade da matéria em estudo impossibilitou o seu aprofundamento, nalguns casos, estimando-se retomar os mesmos, tendo em consideração a sua importância, o que constituirá perspectivas futuras resultantes deste trabalho.

VI. Bibliografia

- Acinetobacter baumannii* MLST Databases, <http://pubmlst.org/abaumannii/> (Consultado a 1/09/2015)
- Aghamiri, S., Amirmozafari, N., Fallah Mehrabadi, J., Fouladatan, B. e Samadi Kafil, H. (2014). Antibiotic Resistance Pattern and Evaluation of Metallo-Beta Lactamase Genes Including *bla*-IMP and *bla*-VIM Types in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran Hospitals. *ISRN Microbiol.* 2014, 1–6. doi:10.1155/2014/941507.
- Alibayov, B., Baba-Moussa, L., Sina, H., Zdeňková, K. e Demnerová, K. (2014). *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5005–5018. doi:10.1007/s11033-014-3367-3.
- Allison, D. G. e Lambert, P. (2015). *Modes of Action of Antibacterial Agents*. Elsevier Ltd doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00032-9.
- Alvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Hancock, R. E. W. e Martínez, J. L. (2010). Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4159–4167. doi:10.1128/AAC.00257-10.
- Andersen, J., He, G.-X., Kakarla, P., Kc, R., Kumar, S., Lakra, W., Mukherjee, M., Ranaweera, I., Shrestha, U., Tran, T. e Varela, M. (2015). Multidrug Efflux Pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* Bacterial Food Pathogens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 1487–1547. doi:10.3390/ijerph120201487.
- Andres, P., Lucero, C., Soler-Bistué, A., Guerriero, L., Albornoz, E., Tran, T., T., Zorrequieta, A., Galas, M., Corso, A., Tolmasky, M. e Petroni, A. (2013). Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical *enterobacteria* with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2467–2475. doi:10.1128/AAC.01615-12.
- Ansaldi, F., Canepa, P., Bassetti, M., Zancolli, M., Molinari, M. P., Talamini, A., Ginocchio, F., Durando, P., Mussap, M., Orengo, G., Viscoli, C. e Icardi, G. (2011). Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: Combined molecular approach for epidemiological investigation. *J. Hosp. Infect.* 79, 134–140. doi:10.1016/j.jhin.2011.05.027.
- Bae, I. K., Jang, S. J., Kim, J., Jeong, S. H., Cho, B. e Lee, K. (2011). Interspecies dissemination of the *bla* gene encoding PER-1 extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1305–1307. doi:10.1128/AAC.00994-10.
- Bartual, S. G., Seifert, H., Hippler, C., Rodríguez-valera, F. e Domí, M. A. (2005). Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4382–4390. doi:10.1128/JCM.43.9.4382.
- Baum, C., Haslinger-Löffler, B., Westh, H., Boye, K., Peters, G., Neumann, C., e Kahl, B. (2009). Non-*spa*-typeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring protein A mutants. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3624–3629. doi:10.1128/JCM.00941-09.

- Bayer, A. S., Mishra, N. N., Sakoulas, G., Nonejuie, P., Nast, C. C., Pogliano, J., Chen, K.-T., Ellison, S., Yeaman, M. e Yang, S.-J. (2014). Heterogeneity of *mprF* sequences in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates: role in cross-resistance between daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7462–7467. doi:10.1128/AAC.03422-14.
- Bayer, A. S., Schneider, T. e Sahl, H. (2013). Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277, 139–158. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06819.x.Mechanisms.
- Beceiro, A., Tomás, M. e Bou, G. (2013). Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 185–230. doi:10.1128/CMR.00059-12.
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. e Kriegeskorte, A. (2014). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 794–804. doi:10.1016/j.ijmm.2014.06.007.
- Bergmann, R., Linden, M., Chhatwal, G. S. e Nitsche-Schmitz, D. P. (2014). Factors that cause trimethoprim resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2281–2288. doi:10.1128/AAC.02282-13.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H., Wright, G. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0034953.
- Bibalan, M. H., Shakeri, F., Javid, N., Ghaemi, A. e Ghaemi, E. A. (2014). Accessory Gene Regulator Types of *Staphylococcus aureus* Isolated in Gorgan, North of Iran. *J. Clin. diagnostic Res.* 8, 7–9. doi:10.7860/JCDR/2014/6971.4219.
- Blaak, H., Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., Docters van Leeuwen, A. E., Lynch, G., Overbeek, W. M., e Husman, A. (2014). Extended spectrum β -lactamase and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Int. J. Food Microbiol.* 168-169, 8–16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006.
- Blair, J. M., Richmond, G. E. e Piddock, L. J. V (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 9, 1165–1177. doi:10.2217/fmb.14.66.
- BLAST®, Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Consultado a 20/11/2015)
- Bogaerts, P., Huang, T.-D., Rodriguez-Villalobos, H., Bauraing, C., Deplano, A., Struelens, M. J., e Glupczynski, Y. (2008). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas putida* isolates producing VIM-2 and VIM-4 metallo- β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 749–751. doi:10.1093/jac/dkm529.
- Borg, M. A. (2012). National cultural dimensions as drivers of inappropriate ambulatory care consumption of antibiotics in Europe and their relevance to awareness campaigns. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 763–767. doi:10.1093/jac/dkr541.

- Brown, P. e Dawson, M. J. (2015). *A perspective on the next generation of antibacterial agents derived by manipulation of natural products*. 1st ed. Welwyn Garden City: Elsevier B.V. doi:10.1016/bs.pmch.2014.10.001.
- Burton, B. e Dubnau, D. (2010). Membrane-associated DNA transport machines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–20. doi:10.1101/cshperspect.a000406.
- Buul, L. W., Steen, J. T., Veenhuizen, R. B., Achterberg, W. P., Schellevis, F. G., Essink, R. T. G. M., Benthem, B., Natsch, S. e Hertogh, C. (2012). Antibiotic use and resistance in long term care facilities. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 13, 568.e1–13. doi:10.1016/j.jamda.2012.04.004.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Visai, L., Corazzari, T., Poggio, C., Maso, A., Pirini, V., Ravaoli, S., Cangini, I., Speziale, P. e Arciola, R. (2010). Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *Int. J. Artif. Organs* 33, 575–581.
- Capasso, C. e Supuran, C. T. (2013). Sulfa and trimethoprim-like drugs – antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 29, 379–387. doi:10.3109/14756366.2013.787422.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 298–304. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
- Cayô, R., Merino, M., Ruiz Del Castillo, B., Cano, M. E., Calvo, J., Bou, G., e Martínez-Martínez, L. (2014). OXA-207, a novel OXA-24 variant with reduced catalytic efficiency against carbapenems in *Acinetobacter pittii* from Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4944–4948. doi:10.1128/AAC.02633-13.
- Chamon, R. C., Iorio, N. L. P., Cavalcante, F. S., da Silva Teodoro, C. R., de Oliveira, A. P. C., Maia, F., e Santos, K. (2014). Linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*: single and double mutations at the domain V of 23S rRNA among isolates from a Rio de Janeiro hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 80, 307–310. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.011.
- Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gao, S., e Jiao, X. (2012). Prevalence of *qnr*, *aac(6’)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3423–3427. doi:10.1128/AAC.06191-11.
- Chen, Y., Liu, Z., Duo, L., Xiong, J., Gong, Y., Yang, J., J., Wang, Z., Wu, X., Lu, Z., Meng, X., Zhao, J., Zhang, C., Wang, F., Zhang, Y., Zhang, M. e Han, L. (2014). Characterization of *Staphylococcus aureus* from distinct geographic locations in China: an increasing prevalence of *spa*-t030 and SCCmec type III. *PLoS One* 9, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0096255.
- Cheng, G., Hao, H., Dai, M., Liu, Z. e Yuan, Z. (2013). Antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur. J. Med. Chem.* 66, 555–562. doi:10.1016/j.ejmech.2013.01.057.
- Cherifi, S., Byl, B., Deplano, A., Nonhoff, C., Denis, O. e Hallin, M. (2013). Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related

- bacteremia and from healthy volunteers. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1541–1547. doi:10.1128/JCM.03378-12.
- Clemente, L., Manageiro, V., Ferreira, E., Jones-Dias, D., Correia, I., Themudo, P., Albuquerque, T. e Caniça, M. (2013). Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 221–228. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.009.
- Coelho, C., Torres, C., Radhouani, H., Pinto, L., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Zaragaza, M., Igrejas, G. e Poeta, P. (2011). Molecular detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from dogs in Portugal. *Microb. drug Resist.* 17, 333–337. doi:10.1089/mdr.2010.0080.
- Conceição, T., Aires-De-Sousa, M., Pona, N., Brito, M. J., Barradas, C., Coelho, R., Sardinha, T., Sancho, L., de Sousa, G., do Céu Machado, M. e Lencastre, H. (2011). High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 293–297. doi:10.1007/s10096-010-1087-8.
- Conceição, T., Coelho, C., Santos-Silva, I., de Lencastre, H. e Aires-de-Sousa, M. (2014). Epidemiology of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* in Luanda, Angola: First Description of the Spread of the MRSA ST5-IVa Clone in the African Continent. *Microb. drug Resist.* 20, 441–449. doi:10.1089/mdr.2014.0007.
- Conejo, M. C., Domínguez, M. C., López-Cerero, L., Serrano, L., Rodríguez-Baño, J. e Pascual, A. (2010). Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying *bla_{IMP-8}*, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1071–1073. doi:10.1093/jac/dkq063.
- Couto, N., Belas, A., Centeno, M., Duijkeren, E. e Pomba, C. (2014). First description of fexA-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from calves in Portugal. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 342–343. doi:10.1016/j.jgar.2014.06.003.
- Cox, G. e Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 287–292. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
- Cuny, C., Layer, F., Werner, G., Harmsen, D., Jurke, A., Mellmann, A., Witte, W. e Köck, R. (2015). State-wide surveillance of antibiotic resistance patterns and *spa* types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures in North. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 750–757. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.013.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C. e Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 490–495. doi:10.1093/jac/dkp498.
- David, M. Z., Siegel, J., Lowy, F. D., Zychowski, D., Taylor, A., Lee, C. J., Boyle-Vavra, S. e Daum, R. (2013). Asymptomatic carriage of sequence type 398, *spa* type t571 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an urban jail: A newly emerging, transmissible pathogenic strain. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2443–2447. doi:10.1128/JCM.01057-13.

- Decré, D., Burghoffer, B., Gautier, V., Petit, J. C. e Arlet, G. (2004). Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum β -lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 881–888. doi:10.1093/jac/dkh440.
- Deurenberg, R. H. e Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 8, 747–763. doi:10.1016/j.meegid.2008.07.007.
- Dhanji, H., Doumith, M., Rooney, P. J., O’Leary, M. C., Loughrey, A. C., Hope, R., Woodford, N. e Livermore, D. (2011). Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in nursing homes in Belfast, UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 297–303. doi:10.1093/jac/dkq463.
- Dib, J. R., Liebl, W., Wagenknecht, M., Fariás, M. E. e Meinhardt, F. (2013). Extrachromosomal genetic elements in *Micrococcus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 63–75. doi:10.1007/s00253-012-4539-5.
- Djahmi, N., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Dekhil, M., Sotto, A. e Lavigne, J.-P. (2014). Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/305784.
- Donk, C. F. M., Schols, J. M. G., Schneiders, V., Grimm, K. H. e Stobberingh, E. E. (2013). Antibiotic resistance, population structure and spread of *Staphylococcus aureus* in nursing homes in the Euregion Meuse-Rhine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1483–1489. doi:10.1007/s10096-013-1901-1.
- Dortet, L., Poirel, L. e Nordmann, P. (2014). Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–12. doi:10.1155/2014/249856.
- Drawz, S. M. e Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160–201. doi:10.1128/CMR.00037-09.
- Durante-mangoni, E. e Zarrilli, R. (2011). Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol.* 6, 407–422. doi:10.2217/fmb.11.23.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I. e Stratchounski, L. (2003). Prevalence and Molecular Epidemiology of β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3724–3732. doi:10.1128/AAC.47.12.3724.
- Ellington, M. J., Hope, R., Turton, J. F., Warner, M., Woodford, N. e Livermore, D. M. (2007). Detection of *qnrA* among *Enterobacteriaceae* from South-East England with extended-spectrum and high-level AmpC beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1176–1178. doi:10.1093/jac/dkm308.
- Empel, J., Filczak, K., Mrówka, A., Hryniewicz, W., Livermore, D. M. e Gniadkowski, M. (2007). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2829–2834. doi:10.1128/JCM.00997-07.

- Endimiani, A., Blackford, M., Dasenbrook, E. C., Reed, M. D., Bajaksouszian, S., Hujer, A. M., Rudin, S., Hujer, K., Prreten, V., Rice, L., Jacobs, M., Konstan, M. e Bonomo, R. (2011). Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1684–1692. doi:10.1128/AAC.01308-10.
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control (2013). Surveillance Report - Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2013. Estocolmo doi:10.2900/39777.
- Evans, B. A. e Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 241–263. doi:10.1128/CMR.00117-13.
- ESAC, European Surveillance of Antimicrobial Consumption. (Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/consumption-rates-by-country.aspx#sthash.3bbKb0MK.dpuf)
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. e Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.* 2, 40–61. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x.
- Fair, R. J. e Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Medicin. Chem.* 6, 25–64. doi:10.4137/PMC.S14459.Received.
- Faires, M. C., Gehring, E., Mergl, J. e Weese, J. S. (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Marine Mammals. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 2071–2072. doi:10.1086/502234.
- Fallah, F., Borhan, R. S. e Hashemi, A. (2013). Detection of *bla*(IMP) and *bla*(VIM) metallo- β -lactamases genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Int. J. Burns Trauma* 3, 122–124.
- Falugi, F., Kim, H. K. e Missiakas, D. M. (2013). Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses. *mBio* 4, 1–9. doi:10.1128/mBio.00575-13.Editor.
- Feria, C., Ferreira, E., Correia, J. D., Gonçalves, J. e Caniça, M. (2002). Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 77–85. doi:10.1093/jac/49.1.77.
- Fernández, L. e Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 661–681. doi:10.1128/CMR.00043-12.
- Fernández, M., Conde, S., de la Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J.-L. e Duque, E. (2012). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1001–1009. doi:10.1128/AAC.05398-11.
- Fernández-Cuenca, F., Rodríguez-Martínez, J. M., Gómez-Sánchez, M. C., de Alba, P. D., Infante-Martínez, V. e Pascual, A. (2012). Production of a plasmid-encoded OXA-72 β -lactamase associated with resistance to carbapenems in a clinical isolate *Acinetobacter junii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 93–94. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.07.017.
- Figueiredo, S., Bonnin, R. A., Poirel, L., Duranteau, J. e Nordmann, P. (2012). Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from

- Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 907–913. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03708.x.
- Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G. J., McEwen, S., Li, X.-Z., Gaze, W. H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D. e Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin. Infect. Dis.* 57, 704–10. doi:10.1093/cid/cit355.
- Foster, T. J. e Geoghegan, J. A. (2015). “*Staphylococcus aureus*,” in *Molecular Medical Microbiology*, eds. Y. W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, and J. Schwartzman (Dublin: Elsevier Ltd), 655–674. doi:10.1128/AAC.03622-14.
- Fournier, G. P., Andam, C. P. e Gogarten, J. P. (2015). Ancient horizontal gene transfer and the last common ancestors. *BMC Evol. Biol.* 15, 1–18. doi:10.1186/s12862-015-0350-0.
- Fujita, A., Kimura, K., Yokoyama, S., Jin, W., Wachino, J., Yamada, K., Suematsu, H., Yamagishi, Y., Mikamo, H. e Arakawa, Y. (2015). Characterization of Piperacillin/Tazobactam-Resistant *Klebsiella oxytoca* Recovered from a Nosocomial Outbreak. *PLoS One* 10, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0142366.
- Gao, W., Chua, K., Davies, J. K., Newton, H. J., Seemann, T., Harrison, P. F., Holmes, N., Rhee, H.-W., Hong, J.-I., Hartland, E., Stinear, T. e Howden, B. (2010). Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog.* 6, e1000944. doi:10.1371/journal.ppat.1000944.
- Gharsa, H., Ben Slama, K., Gómez-Sanz, E., Lozano, C., Zarazaga, M., Messadi, L., Boudabous, A. e Torres, C. (2015). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* from nasal samples of healthy farm animals and pets in Tunisia. *Vector borne zoonotic Dis.* 15, 109–115. doi:10.1089/vbz.2014.1655.
- Gharsa, H., Ben Slama, K., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Klibi, N., Ben Sallem, R., Gómez, P., Zarazaga, M. e Boudabous, A. (2012). Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet. Microbiol.* 156, 367–373. doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.009.
- Ghaznavi-Rad, E., Shamsudin, M. N., Sekawi, Z., Khoon, L. Y., Aziz, M. N., Hamat, R. A., Othman, N., Chong, P., Belkum, A., Ghasemzadeh-Moghaddam, H. e Neela, V. (2010). Predominance and emergence of clones of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *J. Clin. Microbiol.* 48, 867–872. doi:10.1128/JCM.01112-09.
- Giguère, S. (2013). “Lincosamides, Pleuromutilins, and Streptogramins,” in *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, eds. J. F. P. e Steeve Giguère and P. M. Dowling (John Wiley & Sons, Inc.), 199–210. doi:10.1016/0007-1935(89)90107-3.
- Gillings, M. R. (2014). Integrons: past, present, and future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 257–277. doi:10.1128/MMBR.00056-13.
- Gilot, P., Lina, G., Cochard, T. e Poutrel, B. (2002). Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4060–4067. doi:10.1128/JCM.40.11.4060-4067.2002.

- Goldberg, E. e Bishara, J. (2011). Contemporary unconventional clinical use of co-trimoxazole. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 8–17. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03613.x.
- Gomes, A. R., Westh, H. e De Lencastre, H. (2006). Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3237–3244. doi:10.1128/AAC.00521-06.
- Gómez, P., Lozano, C., González-Barrio, D., Zarazaga, M., Ruiz-Fons, F. e Torres, C. (2015). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in a semi-extensive red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) farm in Southern Spain. *Vet. Microbiol.* 177, 326–331. doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.029.
- Gomila, M., Del Carmen Gallegos, M., Fernández-Baca, V., Pareja, A., Pascual, M., Díaz-Antolín, P., García-Valdés, E. e Lalucat, J. (2013). Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol.* 13, 1–10. doi:10.1186/1471-2180-13-138.
- Gruber, I., Heudorf, U., Werner, G., Pfeifer, Y., Imirzalioglu, C., Ackermann, H., Brandt, C., Besier, S. e Wichelhaus, T. (2013). Multidrug-resistant bacteria in geriatric clinics, nursing homes, and ambulant care - Prevalence and risk factors. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 405–409. doi:10.1016/j.ijmm.2013.05.002.
- Grundmann, H., Aanensen, D. M., Wijngaard, C. C., Spratt, B. G., Harmsen, D. e Friedrich, A. W. (2010). Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. *PLoS Med.* 7, 1–15. doi:10.1371/journal.pmed.1000215.
- Harastani, H. H., Araj, G. F. e Tokajian, S. T. (2014). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from a major hospital in Lebanon. *Int. J. Infect. Dis.* 19, 33–38. doi:10.1016/j.ijid.2013.10.007.
- Hashem, R. A., Yassin, A. S., Zedan, H. H. e Amin, M. A. (2013). Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Cairo, Egypt. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7, 796–803. doi:10.3855/jidc.3105.
- Healthcare, G. (2013). *illustra™ ExoProStar™ 1-Step*. 1–4. (Disponível em <http://www.gelifesciences.com/>)
- Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P. e Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, 1–27. doi:10.3389/fmicb.2011.00203.
- Hojabri, Z., Rezaee, M. A., Nahaei, M. R., Soroush, M. H., Ghojzadeh, M., Pirzadeh, T., Davodi, M., Ghazi, M., Bigverdi, R., Pajand, O. e Aghazadeh, M. (2013). Comparison of in vitro activity of doripenem versus old carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from both CF and burn patients. *Adv. Pharm. Bull.* 3, 121–125. doi:10.5681/apb.2013.020.
- Holmes, N. E., Tong, S. Y. C., Davis, J. S. e Hal, S. J. (2015). Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Vancomycin and Beyond. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 36, 17–30. doi:10.1055/s-0034-1397040.

- Hong, D.J., Bae, I.K., Jang, I.H., Jeong, S.H., Kang, H.K. e Lee, K. (2015). Epidemiology and characteristics of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Chemother.* 47, 81–97. doi:10.3947/ic.2015.47.2.81.
- Howden, B. P., Peleg, A. Y. e Stinear, T. P. (2014). The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infect. Genet. Evol.* 21, 575–582. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.047.
- Hunter, P. A., Dawson, S., French, G. L., Goossens, H., Hawkey, P. M., Kuijper, E. J., Nathwani, D., Taylor, D., Teale, C., Warren, R., Wilcox, M., Woodford, N., Wulf, M. e Piddock, L. (2010). Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: Prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 3–17. doi:10.1093/jac/dkp433.
- Ikeda-Dantsuji, Y., Hanaki, H., Sakai, F., Tomono, K., Takesue, Y., Honda, J., Nonomiya, Y., Suwabe, A., Nagura, O., Yanagihara, K., Mikamo, H., Fukuchi, K., Kaku, M., Kohno, S., Yanagisawa, C., Nakae, T., Yoshida, K. e Niki, Y. (2011). Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *J. Infect. Chemother.* 17, 45–51. doi:10.1007/s10156-010-0085-1.
- Javidnia, S., Talebi, M., Saifi, M., Katouli, M., Lari, R. e Pourshafie, M. R. (2013). Clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e691–e695. doi:10.1016/j.ijid.2013.01.032.
- Jayanthi, S. e Jeya, M. (2014). Plasmid Profile Analysis and *bla* VIM Gene Detection of Metallo β -lactamase (MBL) Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Clinical Samples. *J. Clin. diagnostic Res.* 8, DC16–19. doi:10.7860/JCDR/2014/8096.4492.
- Jenkins, C., Ling, C. L., Ciesielczuk, H. L., Lockwood, J., Hopkins, S., McHugh, T. D., Gillespie, S. H. e Kibbler, C. (2012). Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: Comparison of two different approaches in clinical practice. *J. Med. Microbiol.* 61, 483–488. doi:10.1099/jmm.0.030387-0.
- Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Alberti, S., Perez, J. L. e Oliver, A. (2010). Metallo-B-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 474–478. doi:10.1093/jac/dkp491.
- Juhas, M. (2013). Horizontal gene transfer in human pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 1–8. doi:10.3109/1040841X.2013.804031.
- Kaase, M., Szabados, F., Pfennigwerth, N., Anders, A., Geis, G., Pranada, A. B., Rößler, S., Lang, U. e Gatermann, S. (2014). Description of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 81–84. doi:10.1093/jac/dkt325.
- Kaewpoowat, Q. e Ostrosky-Zeichner, L. (2015). Tigecycline : a critical safety review. *Expert Opin. Drug Saf.* 14, 335–342. doi:10.1517/14740338.2015.997206.
- Kali, A., Srirangaraj, S., Kumar, S., Divya, H., Kalyani, A. e Umadevi, S. (2013). Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Australas. Med. J.* 6, 686–693. doi:10.4066/AMJ.2013.1824.
- Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K. e Samuelsen, Ø. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist. Updat.* 15, 237–247. doi:10.1016/j.drug.2012.06.001.

- Keynan, Y., Weber, G. e Sprecher, H. (2007). Molecular identification of *Exiguobacterium acetylicum* as the aetiological agent of bacteraemia. *J. Med. Microbiol.* 56, 563–564. doi:10.1099/jmm.0.46866-0.
- Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C. e Weese, J. S. (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.* 128, 298–303. doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.006.
- Khosravi, Y., Tee Tay, S. e Vadivelu, J. (2010). Metallo-beta-lactamase-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia: detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2, and VIM-11. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67, 294–296. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.010.
- Khudhair, A. M., Saadallah, S. e Al-faham, M. (2011). Isolation of Multi Antibiotic Resistance *Serratia marcescens* and the Detection of AmpC & GES β L Genes by Polymerase Chain Reaction Technique. *Int. Assoc. Jungian Stud.* 22, 329–346.
- Koh, T. H., Wang, G. C. Y. e Sng, L.-H. (2004). IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2334–2336. doi:10.1128/AAC.48.6.2334-2336.2004.
- Kohanski, M., Dwyer, D. J. e Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 423–435. doi:10.1038/nrmicro2333.
- Koo, S. H., Kwon, K. C., Cho, H. H. e Sung, J. Y. (2010). Genetic basis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in chungcheong province, Korea. *Korean J. Lab. Med.* 30, 498–506. doi:10.3343/kjlm.2010.30.5.498.
- Kristich, C. J., Rice, L. B. e Arias, C. A. (2014). “Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance,” in *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, eds. M. Gilmore, D. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary), 1–48.
- Lahey Clinic, β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistat enzymes, <http://www.lahey.org/studies/> (Consultado a 10/08/2015)
- LaMarre, J. M., Howden, B. P. e Mankin, A. S. (2011). Inactivation of the Indigenous Methyltransferase RlmN in *Staphylococcus aureus* Increases Linezolid Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2989–2991. doi:10.1128/AAC.00183-11.
- Larsen, A. R., Stegger, M. e Sørum, M. (2008). *Spa* typing directly from a *mecA*, *spa* and *pvl* multiplex PCR assay - a cost-effective improvement for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surveillance. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 611–614. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01995.x.
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D. F. J., Giske, C. G., Heisig, P., Macgowan, A. P., Mouton, J., Nordmann, P., Rodloff, A., Rossolini, G., Soussy, C.-J., Steinbakk, M., Winstanley, T. e Kahlmeter, G. (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 141–160. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
- Leitner, E., Zarfel, G., Luxner, J., Herzog, K., Pekard-Amenitsch, S., Hoenigl, M., Valentin, T., Feierl, G., Grisold, A., Högenauer, C., Sill, H., Krause, R. e Zollner-Schwetz, I. (2015). Contaminated Handwashing Sinks as the Source of a Clonal Outbreak of KPC-

- 2-Producing *Klebsiella oxytoca* on a Hematology Ward. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 714–716. doi:10.1128/AAC.04306-14.
- Li, Y., Guo, Q., Wang, P., Zhu, D., Ye, X., Wu, S., e Wang, M. (2015). Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 β -lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 48, 101–108. doi:10.1016/j.jmii.2014.04.005.
- Lincopan, N., de Almeida, L. M., Elmor de Araújo, M. R. e Mamizuka, E. M. (2009). Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 281–282. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.02.023.
- Liu, P. Y., Tung, J. C., Ke, S. C. e Chen, S. L. (1998). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2759–2762.
- Livermore, D. (2012). Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J. Intern. Med.* 27, 128–142. doi:10.3904/kjim.2012.27.2.128.
- Locke, J. B., Zuill, D. E., Scharn, C. R., Deane, J., Sahm, D. F., Denys, G. A., Goering, R. e Shaw, K. (2014). Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain 1128105, the First Known Clinical Isolate Possessing the *cfr* Multidrug Resistance Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6592–6598. doi:10.1128/AAC.03493-14.
- Lovering, A. L., Safadi, S. S. e Strynadka, N. C. J. (2012). Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 451–478. doi:10.1146/annurev-biochem-061809-112742.
- Magoulas, G. E., Kostopoulou, O. N., Garnelis, T., Athanassopoulos, C. M., Kournoutou, G. G., Leotsinidis, M., Dinos, G., Papaioannou, D. e Kalpaxis, D. (2015). Synthesis and antimicrobial activity of chloramphenicol–polyamine conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 3163–3174. doi:10.1016/j.bmc.2015.04.069.
- Mąka, Ł., Maćkiw, E., Ścieżyńska, H., Modzelewska, M. e Popowska, M. (2015). Resistance to Sulfonamides and Dissemination of *sul* Genes Among *Salmonella* spp. Isolated from Food in Poland. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 383–389. doi:10.1089/fpd.2014.1825.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Jones-Dias, D., Louro, D., Pinto, M., Diogo, J., e Caniça, M. (2012). Emergence and risk factors of β -lactamase-mediated resistance to oxyimino- β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72, 272–7. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.11.009.
- Maravić, A., Skočibušić, M., Šamanić, I. e Puizina, J. (2012). Antibiotic susceptibility profiles and first report of TEM extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas fluorescens* from coastal waters of the Kaštela Bay, Croatia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2039–2045. doi:10.1007/s11274-012-1006-5.
- Marchiaro, P., Tomatis, P. E., Mussi, M., Pasteran, F., Viale, A. M., Limansky, A. S., e Vila, A. (2008). Biochemical characterization of metallo-beta-lactamase VIM-11 from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2250–2252. doi:10.1128/AAC.01025-07.

- Marshall, B. M. e Levy, S. B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718–733. doi:10.1128/CMR.00002-11.
- McClean, P., Hughes, C., Tunney, M., Goossens, H. e Jans, B. (2011). Antimicrobial prescribing in European nursing homes. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1609–1616. doi:10.1093/jac/dkr183.
- McEvoy, C. R. E., Tsuji, B., Gao, W., Seemann, T., Porter, J. L., Doig, K., Ngo, D., Howden, B. e Stinear, T. (2013). Decreased vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* caused by IS256 tempering of WalkR expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3240–3249. doi:10.1128/AAC.00279-13.
- McGowan, J. E. (2006). Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: Multidrug resistance to the maximum. *Am. J. Infect. Control* 34, S29–S37. doi:10.1016/j.ajic.2006.05.226.
- Mediavilla, J. R., Chen, L., Uhlemann, A.-C., Hanson, B. M., Rosenthal, M., Stanak, K., Koll, B., Fries, B., Armellino, D., Schilling, M., Smith, D., Lowy, F. e Kreiswirth, B. (2012). Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398, New York and New Jersey, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 700–702. doi:10.3201/eid1804.111419.
- Medina, G., Egea, L., Otth, C., Otth, L., Fernández, H., Bocco, J. L. e Sola, C. (2013). Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Southern Chile. *Eur J Clin Microbiol Dis* 32, 1533–1540. doi:10.1007/s10096-013-1907-8.
- Mee-Marquet, N. L., Corvaglia, A., Haenni, M., Bertrand, X., Franck, J.-B., Kluytmans, J., Girard, M., Quentin, R. e François, P. (2014). Emergence of a novel subpopulation of CC398 *Staphylococcus aureus* infecting animals is a serious hazard for humans. *Front. Microbiol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00652.
- Mendes, R. E., Deshpande, L. M. e Jones, R. N. (2014). Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 17, 1–12. doi:10.1016/j.drug.2014.04.002.
- Mete, B., Bilir, Y. A., Aygun, G., Yilmaz, M., Urkmez, S., Dikmez, Y. e Ozturk, R. (2013). *Klebsiella oxytoca* outbreak in an intensive care unit: a probable link to common insulin vial use. *Anaesth. Intensive Care* 41, 266–269.
- Min, L., Galecki, A. e Mody, L. (2015). Functional Disability and Nursing Resource Use Are Predictive of Antimicrobial Resistance in Nursing Homes. *J. Am. Geriatr. Soc.* 63, 659–666. doi:10.1111/jgs.13353.
- Modi, S. R., Collins, J. J. e Relman, D. (2014). Antibiotics and the gut microbiota. *J. Clin. Invest.* 124, 4212–4218. doi:10.1172/JCI72333.themselves.
- Mohan, D. e Railey, M. (2015). *Sphingomonas paucimobilis* Peritonitis : A Case Report and Review of the Literature. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant.* 26, 567–571. doi:10.4103/1319-2442.157371.
- Moise-Broder, P., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Schentag, J. J., Forrest, A. e Moellering, R. C. (2004). Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin. Infect. Dis.* 38, 1700–1705. doi:10.1086/421092.

- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., Porcel, M., Torre, J., Segura, A., Plesiat, P., Jeannot, K. e Ramos, J.-L. (2014). Antibiotic Resistance Determinants in a *Pseudomonas putida* Strain Isolated from a Hospital. *PLoS One* 9, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0081604.
- Mugnier, P. D., Poirel, L., Naas, T. e Nordmann, P. (2010). Worldwide Dissemination of the bla OXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 35–40. doi:10.3201/eid1601.090852.
- Naas, T., Aubert, D., Lambert, T. e Nordmann, P. (2006). Complex Genetic Structures with Repeated Elements, a sul -Type Class 1 Integron, and the bla VEB Extended-Spectrum β -Lactamase Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1745–1752. doi:10.1128/AAC.50.5.1745.
- Nei, T., Sonobe, K., Onodera, A., Itabashi, T., Yamaguchi, H., Maeda, M. e Saito, R. (2015). Two cases with bacteremia suspected to be due to relatively rare *Pseudomonas (Flavimonas) oryzihabitans*. *J. Infect. Chemother.* 21, 751–755. doi:10.1016/j.jiac.2015.06.005.
- Nordmann, P., Dortet, L. e Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol. Med.* 18, 263–72. doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003.
- Nordmann, P. e Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 821–830. doi:10.1111/1469-0691.12719.
- OMS, Organização Mundial de Saúde (2014). Antimicrobial Resistance: global report on surveillance.
- Oud, L. (2011). Community-acquired meningitis due to *Staphylococcus capitis* in the absence of neurologic trauma, surgery, or implants. *Hear. Lung* 40, 467–471. doi:10.1016/j.hrtlng.2010.09.002.
- Pajić, M. J., Rašić, Z. B., Velebit, B. M., Boboš, S. F., Mihajlović-ukropina, M. M., Radinović, M. Ž., Galfi, A., Petković, S. e Trojačanec, S. (2014). The prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine and human origin. *Vet. Arch.* 84, 205–214.
- Paterson, G. K., Harrison, E. M. e Holmes, M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22, 42–47. doi:10.1016/j.tim.2013.11.003.
- Pellegrini, C., Mercuri, P. S., Celenza, G., Galleni, M., Segatore, B., Sacchetti, E., Volpe, R., Amicosante, G. e Perilli, M. (2009). Identification of blaIMP-22 in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: Biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 901–908. doi:10.1093/jac/dkp061.
- Pereira, P. M. A., Binatti, V. B., Sued, B. P. R., Ramos, J. N., Peixoto, R. S., Simões, C., Castro, E., Duarte, J., Vieira, V., Hirata Jr., R., Santos, K., Mattos-Guaraldi, A. e Pereira, J. (2014). *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78, 85–92. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.026.

- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E. e Crandall, K. a. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 16, 38–53. doi:10.1016/j.meegid.2013.01.009.
- Pires, J., Novais, A. e Peixe, L. (2013). Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4281–4283. doi:10.1128/JCM.01634-13.
- Poirel, L., Potron, A. e Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1597–1606. doi:10.1093/jac/dks121.
- Pomba, C., Baptista, F. M., Couto, N., Loução, F. e Hasman, H. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates with indistinguishable Apal restriction patterns in colonized and infected pigs and humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2479–2481. doi:10.1093/jac/dkq330.
- Porrero, M. C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Gómez-Barrero, S., Navarro-Gonzalez, N., Serrano, E., Casas-Díaz, E., Marco, I., Fernández-Garayzabal, J.-F., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S. e Domínguez, L. (2013). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. *Vet. J.* 198, 127–130. doi:10.1016/j.tvjl.2013.06.004.
- Purrello, S. M., Daum, R. S., Edwards, G. F. S., Lina, G., Lindsay, J., Peters, G. e Stefani, S. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 61–69. doi:10.1016/j.jgar.2014.02.003.
- Pyörälä, S., Baptiste, K. E., Catry, B., Duijkeren, E., Greko, C., Moreno, M. A., Pomba, M., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E., Torren-Edo, J. e Törneke, K. (2014). Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. *Vet. J.* 200, 230–239. doi:10.1016/j.tvjl.2014.02.028.
- Ramirez, M. S. e Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 13, 151–171. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003.Aminoglycoside.
- Rasigade, J.-P., Raulin, O., Picaud, J.-C., Tellini, C., Bes, M., Grando, J., Saïd, M., Claris, O., Etienne, J., Tigaud, S. e Laurent, F. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* with reduced vancomycin susceptibility causes late-onset sepsis in intensive care neonates. *PLoS One* 7, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0031548.
- Reynolds, J. e Wigneshweraraj, S. (2011). Molecular Insights into the Control of Transcription Initiation at the *Staphylococcus aureus agr* operon. *J. Mol. Biol.* 412, 862–881. doi:10.1016/j.jmb.2011.06.018.
- Rice, L. B. (2012). Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clin. Proc.* 87, 198–208. doi:10.1016/j.mayocp.2011.12.003.
- Ridom GmbH, Ridom SpaServer, <http://www.spaserver.ridom.de/> (Consultado a 30/10/2015)
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D. F., Jacoby, G. e Hooper, D. C. (2006). qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2872–2874. doi:10.1128/AAC.01647-05.

- Rogers, B. A., Aminzadeh, Z., Hayashi, Y. e Paterson, D. L. (2011). Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clin. Infect. Dis.* 53, 49–56. doi:10.1093/cid/cir273.
- Sabala, I., Jagielska, E., Bardelang, P. T., Czapinska, H., Dahms, S. O., Sharpe, J., James, R., Than, M., Thomas, N. e Bochtler, M. (2014). Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. *FEBS J.* 281, 4112–4122. doi:10.1111/febs.12929.
- Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Moellering, Jr., R. C., Novick, R. P., Venkataraman, L., Wennersten, C., DeGirolami, P., Schwaber, M. e Gold, H. (2003). *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) Group II: Is There a Relationship to the Development of Intermediate-Level Glycopeptide Resistance? *J. Infect. Dis.* 187, 929–938. doi:10.1086/368128.
- Sangurdekar, D. P., Zhang, Z. e Khodursky, A. B. (2011). The association of DNA damage response and nucleotide level modulation with the antibacterial mechanism of the anti-folate drug Trimethoprim. *BMC Genomics* 12, 583–597. doi:10.1186/1471-2164-12-583.
- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J. e Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 927–948. doi:10.1128/CMR.00044-14.
- Schleinitz, K. M., Vallaey, T. e Kleinstaub, S. (2010). Structural characterization of ISCR8, ISCR22, and ISCR23, subgroups of IS91-like insertion elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4321–4328. doi:10.1128/AAC.00006-10.
- Sekiguchi, J. I., Asagi, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kasai, A., Mizuguchi, Y., Araake, M., Fujino, T., Kikuchi, H., Sasaki, S., Watari, H., Kojima, T., Miki, H., Kanemitsu, K., Kunishima, H., Kikuchi, Y., Kaku, T., Yoshikura, H., Kuratsuji, T. e Kirikae, T. (2007). Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45, 979–989. doi:10.1128/jcm.01772-06.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P. K., Kundu, S. e Gupta, H. S. (2009). *Exiguobacterium acetylicum* strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 131–137. doi:10.1007/s11274-008-9874-4.
- Shore, A. C., Deasy, E. C., Slickers, P., Brennan, G., O’Connell, B., Monecke, S., Ehrlich, R. e Coleman, D. (2011). Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3765–3773. doi:10.1128/AAC.00187-11.
- Silva, P. V., Souza Cruz, R., Keim, L. S., de Paula, G. R., Ferreira Carvalho, B. T., Coelho, L. R., Carvalho, M., da Rosa, J., Figueiredo, A. e Teixeira, L. (2013). The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 812–816. doi:10.1590/0074-0276108062013022.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. e de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 434–452. doi:10.1128/MMBR.00020-10.

- Smith, R. e Coast, J. (2013). The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ Br. Med. J.* 346, 1–5. doi:10.1136/bmj.f1493.
- Smyth, D. S., Feil, E. J., Meaney, W. J., Hartigan, P. J., Tollersrud, T., Fitzgerald, J. R., Entight, M. e Smyth, C. (2009). Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 58, 1343–1353. doi:10.1099/jmm.0.009837-0.
- Soliman, R. S., Phillips, G., Whitty, P. e Edwards, D. H. (2009). Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus spa* types isolated from health-care workers and patients in a Scottish university teaching hospital. *J. Med. Microbiol.* 58, 1190–1195. doi:10.1099/jmm.0.010132-0.
- Sommer, M. O. e Dantas, G. (2011). Antibiotics and the resistant microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 556–563. doi:10.1016/j.mib.2011.07.005.
- Staphylococcus aureus*, <http://saureus.beta.mlst.net/> (Consultado a última vez a 1/10/2015)
- Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nübel, U. e Witte, W. (2008). *Spa*-typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J. Clin. Microbiol.* 46, 574–581. doi:10.1128/JCM.01599-07.
- Sun, J., Deng, Z. e Yan, A. (2014). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Mechanisms, Physiology and Pharmacological Exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1–14. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.090.
- Sunde, M., Tharaldsen, H., Marstein, L., Haugum, M., Norström, M., Jacobsen, T. e Lium, B. (2011). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 8 in pigs, production environment, and human beings. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 348-350.
- Takano, T., Ohtsu, Y., Terasaki, T., Wada, Y. e Amano, J. (2011). Prosthetic valve endocarditis caused by *Staphylococcus capitis*: report of 4 cases. *J. Cardiothorac. Surg.* 6, 1–6. doi:10.1186/1749-8090-6-131.
- Takaya, A., Kimura, A., Sato, Y., Ishiwada, N., Watanabe, M., Matsui, M., Shibayama, K. e Yamamoto, T. (2014). Molecular characterization of linezolid-resistant CoNS isolates in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1–6. doi:10.1093/jac/dku443.
- Tavares, A., Faria, N. A., De Lencastre, H. e Miragaia, M. (2014). Population structure of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) in Portugal over a 19-year period (1992-2011). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 423–432. doi:10.1007/s10096-013-1972-z.
- Tavares, A., Miragaia, M., Rolo, J., Coelho, C. e De Lencastre, H. (2013). High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: Evidence for the blurring of community-hospital boundaries. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1269–1283. doi:10.1007/s10096-013-1872-2.
- Tawil, N., Mouawad, F., Lévesque, S., Sacher, E., Mandeville, R. e Meunier, M. (2013). The differential detection of methicillin-resistant, methicillin-susceptible and borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* by surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron.* 49, 334–340. doi:10.1016/j.bios.2013.05.031.

- Tena, D., Martínez, N. M., Casanova, J., García, J. L., Román, E., Medina, M. J. e Sáez-Nieto, J. (2014). Possible *Exiguobacterium sibiricum* Skin Infection in Human. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 2178–2179. doi:http://dx.doi.org/10.3201/eid2012.140493.
- Tenover, F. C., Tickler, I. A., Goering, R. V., Kreiswirth, B. N., Mediavilla, J. R. e Persing, D. H. (2012). Characterization of Nasal and Blood Culture Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients in United States Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1324–1330. doi:10.1128/AAC.05804-11.
- Tevell, S., Claesson, C., Hellmark, B., Söderquist, B. e Nilsson-Dotter-Augustinsson, Å. (2014). Heterogeneous glycopeptide intermediate *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 911–917. doi:10.1007/s10096-013-2025-3.
- The Department of Infectious Disease Epidemiology, eBURSTV3, <http://eburst.mlst.net/> (Consultado a última vez a 6/11/2015)
- Theuretzbacher, U. (2013). Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 1, 63–69. doi:10.1016/j.jgar.2013.03.010.
- Thomas, J. C., Godfrey, P., Feldgarden, M. e Robinson, D. A. (2012). Draft genome sequences of *Staphylococcus aureus* sequence type 34 (ST34) and ST42 hybrids. *J. Bacteriol.* 194, 2740–2741. doi:10.1128/JB.00248-12.
- Tian, Y., Li, T., Zhu, Y., Wang, B., Zou, X. e Li, M. (2014). Mechanisms of linezolid resistance in *staphylococci* and *enterococci* isolated from two teaching hospitals in Shanghai, China. *BMC Microbiol.* 14, 1–15. doi:10.1186/s12866-014-0292-5.
- Tibayrenc, M. e Ayala, F. J. (2012). Reproductive clonality of pathogens: a perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3305–E3313. doi:10.1073/pnas.1212452109.
- Toleman, M. A. e Walsh, T. R. (2011). Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 912–935. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x.
- Tortora, G., Funke, B. e Case, C. (2010). *Microbiology: an introduction*. 10ª ed. , ed. L. Berriman Estados Unidos da América: Benjamin Cummings
- Towner, K. J., Levi, K. e Vlassiadi, M. (2008). Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 161–167. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01911.x.
- Tsakris, A., Poulou, A., Markou, F., Pitiriga, V., Piperaki, E.-T., Kristo, I. e Pournaras, S. (2011). Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3164–3168. doi:10.1128/AAC.00102-11.
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M. e Pitt, T. (2006). The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 72–77. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x.

- Uivarosi, V. (2013). Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules* 18, 11153–11197. doi:10.3390/molecules180911153.
- Velasco, V., Buyukcangaz, E., Sherwood, J. S., Stepan, R. M., Koslofsky, R. J. e Logue, C. M. (2015). Characterization of *Staphylococcus aureus* from Humans and a Comparison with Isolates of Animal Origin, in North Dakota, United States. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0140497.
- Vestergaard, M., Cavaco, L. M., Sirichote, P., Unahalekhaka, A., Dangsakul, W., Svendsen, C. A., Aarestrup, F. e Hendriksen, R. (2012). Sccmec type IX element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* spa type t337 (CC9) isolated from pigs and pork in Thailand. *Front. Microbiol.* 3, 1–4. doi:10.3389/fmicb.2012.00103.
- Viedma, E., Juan, C., Villa, J., Barrado, L., Orellana, M. Á., Sanz, F., Otero, J., Oliver, A. e Chaves, F. (2012). VIM-2–producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1235–1241. doi:10.3201/eid1808.111234.
- Votintseva, A., Fung, R., Miller, R. R., Knox, K., Godwin, H., Wyllie, D. H., Bowden, R., Crook, D. e Walker, S. (2014). Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiol.* 14, 1–11. doi:10.1186/1471-2180-14-63.
- Walsh, T. R. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, S8–S14. doi:10.1016/S0924-8579(10)70004-2.
- Wang, J., Lin, D.-C., Guo, X.-M., Wei, H.-K., Liu, X.-Q., Chen, X.-J., Guo, J.-Y., Zeng, Z.-L. e Liu, J.-H. (2015). Distribution of the Multidrug Resistance Gene *cfr* in *Staphylococcus* Isolates from Pigs, Workers, and the Environment of a Hog Market and a Slaughterhouse in Guangzhou, China. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 598–605. doi:10.1089/fpd.2014.1891.
- Wang, W.-Y., Chiueh, T.-S., Sun, J.-R., Tsao, S.-M. e Lu, J.-J. (2012a). Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from blood in Taiwan. *PLoS One* 7 (1), 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0030394.
- Wang, Y., Wu, C., Zhang, Q., Qi, J., Liu, H., Wang, Y., He, T., Ma, L., Lai, J., Shen, Z., Liu, Y. e Shen, J. (2012b). Identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS One* 7 (5), 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0037152.
- Wilson, D. N. (2009). The A–Z of bacterial translation inhibitors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 393–433. doi:10.3109/10409230903307311.
- Wipf, J. R. K., Schwendener, S., and Perreten, V. (2014). The novel MLSB resistance gene erm(44) is associated with a prophage in *Staphylococcus xylosus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6133–6138. doi:10.1128/AAC.02949-14.
- Worthington, R. J. e Melander, C. (2013). Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. *J. Org. Chem.* 78, 4207–4213. doi:10.1021/jo400236f.Overcoming.
- Wu, J. J., Ko, W. C., Tsai, S. H. e Yan, J. J. (2007). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1223–1227. doi:10.1128/AAC.01195-06.

- Yıldız, Ö., Çoban, A. Y., Şener, A. G., Coşkun, S. A., Bayramoğlu, G., Güdücüoğlu, H., Özyurt, M., Tatman-Otkun, M., Karabiber, N., Özkütük, N., Aktepe, O., Öncü, S., Arslan, U. e Bozdoğan, B. (2014). Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 13, 1–6. doi:10.1186/s12941-014-0044-2.
- Yousefi, S., Nahaei, M. R., Farajnia, S., Aghazadeh, M., Iversen, A., Edquist, P., Maâtallah, M. e Giske, C. (2012). A multiresistant clone of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 121, 146–152. doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02948.x.
- Zafer, M. M., Al-Agamy, M. H., El-Mahallawy, H., Amin, M. e Ashour, M. S. E.-D. (2014). Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cancer Patients. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–8. doi:10.1155/2014/101635.
- Zárate, M. S., Gales, A. C., Picão, R. C., Pujol, G. S., Lanza, A. e Smayevsky, J. (2008). Outbreak of OXY-2-Producing *Klebsiella oxytoca* in a renal transplant unit. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2099–2101. doi:10.1128/JCM.00194-08.
- Zhao, W. e Hu, Z. (2011). Epidemiology and genetics of VIM-type metallo-β-lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol.* 6, 317–333. doi:10.2217/fmb.11.13.
- Zhao, W.-H. e Hu, Z.-Q. (2010). Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 245–258. doi:10.3109/1040841X.2010.481763.
- Zhou, W., Niu, D., Cao, X., Ning, M., Zhang, Z., Shen, H. e Zhang, K. (2015). Clonal dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* with G2603T mutation in domain V of the 23S rRNA and the *cfr* gene at a tertiary care hospital in China. *BMC Infect. Dis.* 15, 1–6. doi:10.1186/s12879-015-0841-z.
- Zhou, Z., Guan, R., Yang, Y., Chen, L., Fu, J., Deng, Q., Xie, Y., Huang, Y., Wang, J., Wang, D., Liao, C., Gong, S. e Xia, H. (2012). Identification of New Delhi metallo-β-lactamase gene (NDM-1) from a clinical isolate of *Acinetobacter junii* in China. *Can. J. Microbiol.* 58, 112–115. doi:http://dx.doi.org/10.1139/w11-112.

VI. Anexos

Anexo i.

CIP 5µg	TMN 10µg	GEN 10µg	AN 30µg
CCA 30+10µg	CCTX 30+10µg	CTX 30µg	CAZ 30µg
FEP 30µg	DOR 10µg	IPM 10µg	CAZ 10µg
TPZ 30+6µg	MEM 10µg	ERT 10µg	

Figura a. Posição dos discos com antibiótico em placas de *Mueller-Hinton* agar (120 mm × 120 mm) para *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., no método de difusão em disco (as abreviaturas dos antibióticos encontram-se na Tabela 3).

AMX 25µg	AMP 10µg	CCA 30+10µg	ATM 30µg	CIP 5µg	OFX 5µg	LEV 5µg	SXT 1,25+23,75 µg
AMC 20+10µg	CCTX 30+10µg	CTX 30µg	CPD 10µg	TMN 10µg	GEN 10µg	AN 30µg	
FEP 30µg	DOR 10µg	IPM 10µg	CAZ 30µg		PIP 30µg	TCC 75+10µg	CXM 30µg
TPZ 30+6µg	MEM 10µg	ERT 10µg	FOX 30µg	CTX 5µg	CAZ 10µg	CRO 30µg	CPT 5µg

Figura b. Posição dos discos com antibiótico na 1ª. (à esquerda) e 2ª. (à direita) placas de *Mueller-Hinton* agar (120 mm × 120 mm) para *Enterobacteriaceae*, no método de difusão em disco (as abreviaturas dos antibióticos encontram-se na Tabela 3).

Anexo ii.

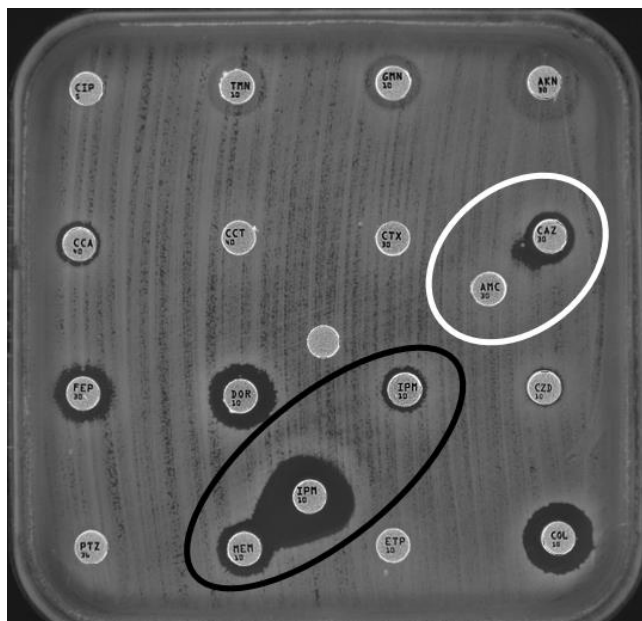


Figura c. Método de difusão em disco para uma das estirpes de *A. baumannii* produtora de carbapenemases OXA-66 e OXA-23. Círculo preto = sinergia entre IMP+DPA e carbapenemes e diferença ≥ 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição de IMP+DPA e IMP; círculo branco = sinergia entre CAZ e AMC+CLOX.

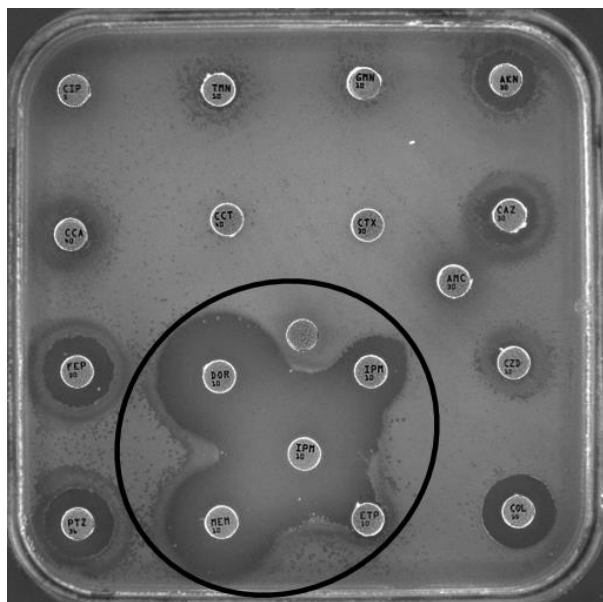


Figura d. Método de difusão em disco para a estirpe de *P. aeruginosa* produtora de MBL VIM-11 (20185). Círculo preto = sinergia entre IMP+DPA e carbapenemes e diferença ≥ 5 mm entre os diâmetros dos halos de inibição de IMP+DPA e IMP.

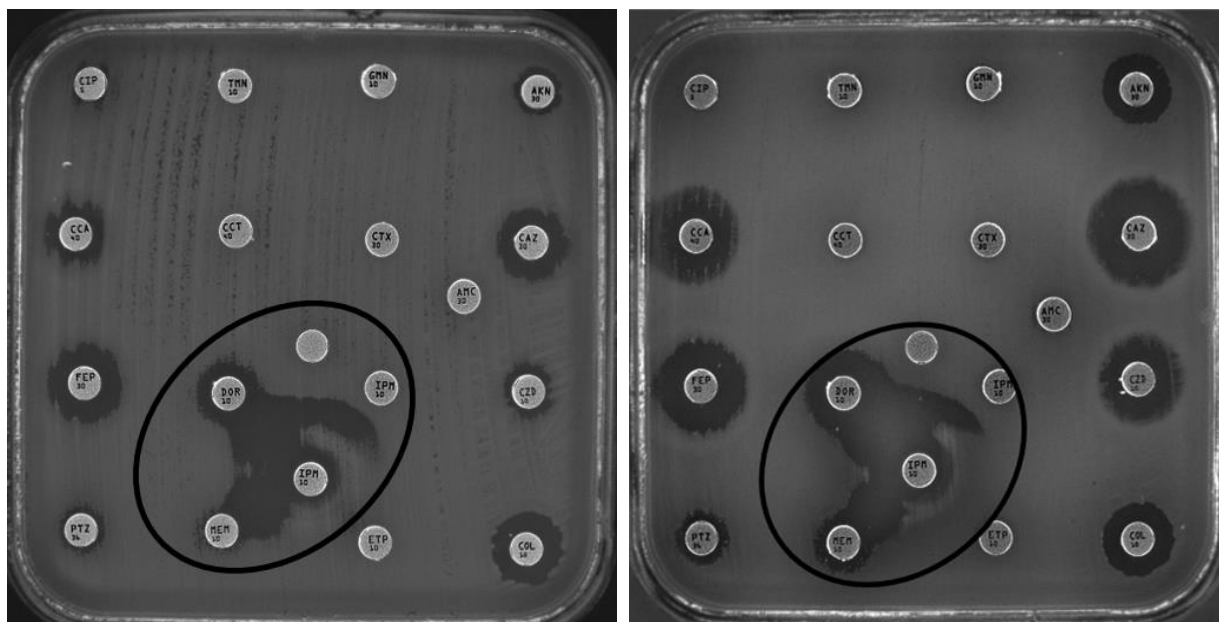


Figura e. Método de difusão em disco para as duas estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de MBL VIM-2 (19996 à esquerda e 20018 à direita). Círculo preto = sinergia entre IMP+DPA e carbapenemes.

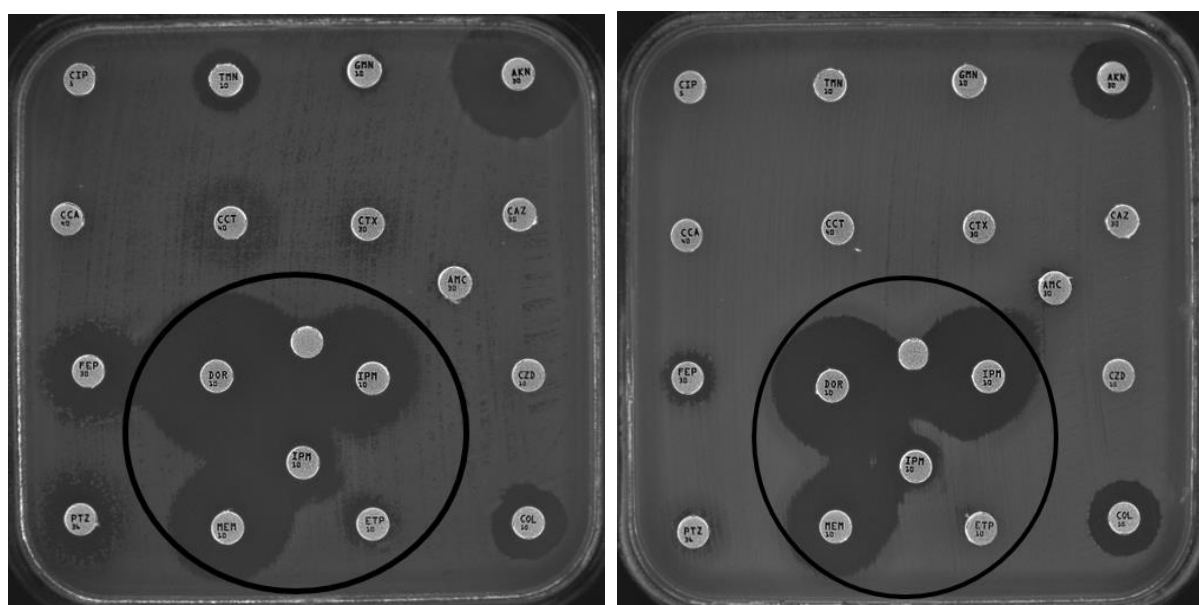


Figura f. Método de difusão em disco para as duas estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de ESBL GES-7-tipo (19940 à esquerda e 20183 à direita). Círculo preto = sinergia entre IMP+DPA e carbapenemes e entre o ácido borônico os carbapenemes.

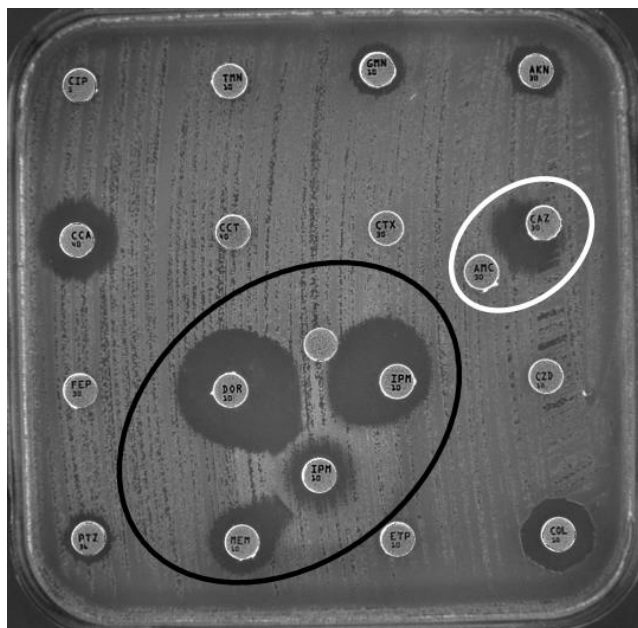


Figura g. Método de difusão em disco para a das estirpes de *P. aeruginosa* produtora de β -lactamases VEB-tipo (19962). Círculo preto = sinergia entre IMP+DPA e carbapenemes; círculo branco = sinergia entre CAZ e AMC+CLOX.